

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2013/2014

Deteção de *galaxolide* em lamas de ETAR

Mariana Ribeiro Mendes

Dissertação submetida para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Cidália Maria de Sousa Botelho (Professor Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

Orientador académico: Doutora Lúcia Maria da Silveira Santos (Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

Co- orientadores: Doutora Arminda Alves (Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto) e Doutora Vera Homem (Investigadora Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto)

janeiro de 2014

Agradecimentos

A realização desta tese apenas foi possível devido ao apoio e à energia positiva de um grupo muito especial de pessoas que me acompanharam neste percurso.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Departamento de Engenharia Química e ao LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia) por disponibilizar os meios para este trabalho.

Agradeço à ETAR de Parada, à Eng^a Marília Ramalho pela sua simpatia e por ter fornecido as amostras de lama para a realização deste trabalho.

Agradeço à Doutora Lúcia Santos pela sua ajuda, disponibilidade e principalmente pela sua compreensão nos momentos mais difíceis.

À Doutora Arminda Alves por me ter permitido participar neste projeto e enriquecer os meus conhecimentos.

À Doutora Vera Homem pelo seu acompanhamento constante, pelos seus ensinamentos e pela sua paciência.

À Eng^a Patrícia Correia por ter partilhado a sua experiência e sabedoria comigo e por ter abdicado de algum do seu tempo por mim.

Ao Eng^o José Avelino por me ter fornecido bases importantes à realização do trabalho.

Ao Sr. Serafim, à Fátima e ao Eng^o Zé Luís pela sua simpatia e por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os membros do laboratório MIA201, que contribuíram para um bom ambiente de trabalho em laboratório, em especial à Sara Ramos pela sua boa disposição.

Um especial agradecimento à minha família e aos meus amigos que sempre me incentivaram e me renovaram o humor e a energia.

Resumo

Os produtos de limpeza e de higiene pessoal fazem parte da rotina de milhões de pessoas em todo o mundo, todos os dias e a qualquer hora. Estes produtos contêm na sua formulação compostos orgânicos que lhes conferem aroma. Os *musks* são um exemplo desta classe de compostos e têm como principais objetivos conferir fragrância e fixar o aroma. Os *musks* pertencem a uma família de compostos orgânicos persistentes e bioacumulativos e hoje em dia são considerados poluentes emergentes. As características físico-químicas destes compostos permitem que eles se acumulem em matrizes ambientais como águas, solos, atmosfera e, como é demonstrado neste trabalho, em lamas de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). O *galaxolide* (HHCB) é considerado o *musk* mais utilizado a nível mundial e que, como alguns estudos demonstram, tem a capacidade de inibir a atividade hormonal.

Neste estudo analisou-se o *galaxolide* nas lamas tratadas da ETAR de Parada. Para tal, foram realizados ensaios de extração em amostras de lama húmida e seca pelo método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) e a análise foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC- FL). A extração através de QuEChERS foi realizada nas seguintes condições: 2 g de amostra, 15 mL de acetonitrilo, QuEChER 1: 6000 mg de MgSO_4 e 1500 mg de CH_3COONa e QuEChER 2: 900 mg de MgSO_4 , 300 mg de PSA (amina primária/secundária) e 100 mg de C_{18} (sorbente à base de sílica).

A validação do método permitiu obter uma gama de linearidade da resposta analítica de 1 $\mu\text{g/L}$ a 200 $\mu\text{g/L}$ (correspondente a uma gama entre 5 ng/g e 1000 ng/g), tendo a reta de calibração um coeficiente de correlação de 0,9999. Os limites de deteção e quantificação do método analítico foram 0,29 $\mu\text{g/L}$ e 0,97 $\mu\text{g/L}$, respetivamente. As recuperações da lama extraída a húmido e da lama extraída a seco apresentaram valores médios semelhantes, cerca de 78% e 69%, respetivamente. Para este trabalho também se determinou a incerteza global da metodologia adotada, tendo-se obtido uma incerteza de cerca de 17% para a gama de concentrações mais elevada (entre 10 e 200 $\mu\text{g/L}$), aumentando exponencialmente até 69% para o padrão de concentração mais baixa (1 $\mu\text{g/L}$).

Em todas as amostras de lama tratada recolhidas na ETAR de Parada foi detetado *galaxolide*. Para a lama extraída a seco o valor médio de concentração de *galaxolide* foi de 5253 ng/g e para a lama extraída a húmido de 24781 ng/g.

Abstract

Personal care products and household cleaners are part of the routine of millions of people around the world, everyday and anytime. These products contain compounds in their organic formulation that are able to fix the fragrances. The *musks* are an example of this class of compounds and have as main objectives to give and fix the fragrance. *Musks* are a family of persistent and bioaccumulative organic compounds and are considered emerging pollutants. The physico-chemical characteristics of these compounds allow them to accumulate in environmental matrices such as water, soil, atmosphere and, as is demonstrated in this work, in wastewater treatment plants (WWTP). Galaxolide (HHCB) is considered to be the most used *musk* in the world and, as some studies demonstrated, it has the ability to inhibit hormonal activity.

In this study galaxolide, from wastewater treatment plant sludge, was analyzed. For this purpose, extraction tests were performed on samples of wet and dry sludge by QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and the analyzes were performed by liquid chromatography with high efficiency using a fluorescence detector (HPLC-FL). The extraction was performed by QuEChERS method under the following conditions: 2 g of sample, 15 mL of acetonitrile, QuEChER 1: 6000 mg and 1500 mg of MgSO_4 and CH_3COONa QuEChER 2: 900 mg of MgSO_4 , 300 mg of PSA (primary/ secondary amine) and 100 mg of C_{18} (silica sorbent).

The validation of the method allowed a range of linearity of the analytical response of 1 mg/L to 200 g/L (corresponding to a range of 5 ng/g and 1000 ng/g), and the correlation coefficient of the calibration curve was 0.9999. The detection and quantification limits of the analytical method were 0.29 mg/L and 0.97 mg/L, respectively. Recoveries of wet and dry extracted sludge showed similar mean values, about 78% and 69%, respectively. For this work it was also determined the global uncertainty of the methodology, with an uncertainty of 17% for the highest concentration range (between 10 and 200 mg/L), increasing exponentially up to 69% for the lowest standard concentration (1 $\mu\text{g/L}$).

Galaxolide was detected in all samples of treated sludge collected at the Parada WWTP. To dry sludge extraction the average concentration of HHCB was 5253 ng/g and for the wet sludge extraction the concentration was 24781 ng/g.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Os <i>Musks</i>	1
1.1.1	<i>Musks</i> Naturais	1
1.1.2	<i>Musks</i> Sintéticos	2
1.2	Deteção de <i>musks</i> em matrizes ambientais.....	8
1.3	Percurso dos <i>musks</i> numa ETAR.....	10
1.4	Técnicas de Extração, <i>Cleanup</i> e Análise.....	12
1.4.1	Métodos de extração e <i>cleanup</i>	12
1.4.2	Metodologia de análise do <i>galaxolide</i>	16
2	Estado da Arte	20
2.1	Deteção de <i>galaxolide</i> em lamas de ETAR.....	20
3	Descrição Técnica	30
3.1	Reagentes.....	30
3.2	Preparação de Padrões.....	30
3.3	Amostragem.....	30
3.4	Extração e <i>cleanup</i>	32
3.5	Instrumentação.....	34
3.6	Controlo de qualidade.....	34
3.7	Acondicionamento de Resíduos.....	35
4	Resultados e Discussão	36
4.1	Validação do método analítico para deteção de <i>galaxolide</i> em lamas de ETAR	36
4.1.1	Reta de calibração	36
4.1.2	Limites de deteção e quantificação	37
4.1.3	Avaliação da Precisão	38
4.1.4	Avaliação da Exatidão	39
4.1.5	Incerteza Global	40
4.2	Deteção de <i>galaxolide</i> nas lamas da ETAR de Parada.....	42

Conclusões	46
5 Limitações e Trabalho Futuro	47
6 Bibliografia	48
Anexo 1 - Preparação de padrões	57
Anexo 2 - Parâmetros de validação do método analítico	58
Anexo 3 - Galaxolide nas lamas da ETAR de Parada	65

Índice de Figuras

Figura 1-Animais utilizados na extração de <i>musks</i> : a) Veado almiscarado, b) Rato almiscarado, c) Boi almiscarado e d) Gato almiscarado.	2
Figura 2-Plantas utilizadas para a extração de <i>musks</i> naturais: a) <i>Abelmoschus moschatus</i> , b) <i>Angelica archangelica</i> , c) <i>Curcumis melo</i>	2
Figura 3- Fluxograma representativo do funcionamento de uma ETAR.	11
Figura 4- Montagem de uma extração em Soxhlet	13
Figura 5- Equipamento utilizado na extração por ASE	13
Figura 6- Montagem de SPE	15
Figura 7- Equipamento de SPME.....	16
Figura 8- Esquema representativo de um sistema de HPLC: A e B - Fase Móvel, C- Sistema de bombagem, D- Sistema de Injeção, E- Pré-coluna e coluna, F- Detetor, G- Interface, H- Sistema de aquisição de dados.....	17
Figura 9- Injetor de válvula: a) posição de carga “load”, b) posição de injeção “inject”.....	18
Figura 10- Exemplo de um cromatograma.	19
Figura 11- Fluxograma do método de extração QuEChERS.	33
Figura 12-HPLC com detetor de fluorescência e sistema de aquisição de dados.	34
Figura 13-Reta de calibração para o <i>galaxolide</i> e os seus limites de confiança (95%).	36
Figura 14-Cromatograma resultante da injeção da solução padrão de <i>galaxolide</i> de 200 µg/L.	37
Figura 15- Peso de cada uma das fontes de incerteza no cálculo da incerteza global.	41
Figura 16-Incerteza global em função da concentração.	41
Figura 17-Gráfico das concentrações de HHCB corrigidos pelo valor de recuperação.	43
Figura 18- Cromatograma da a) lama seca extraída, b) lama húmida extraída.	43

Índice de Tabelas

Tabela 1- Estrutura química e propriedades dos principais nitro <i>musks</i>	4
Tabela 2- Estrutura química e propriedades dos principais <i>musks</i> policíclicos.....	6
Tabela 3- Estrutura química e propriedades de alguns <i>musks</i> macrocíclicos.....	7
Tabela 4- Estrutura química e propriedades de alguns <i>musks</i> alicíclicos.	8
Tabela 5- Estudos realizados para a determinação de <i>galaxolide</i> em lamas de ETAR.	26
Tabela 6- Desvio padrão relativo determinado para a precisão intermédia e repetibilidade.....	38
Tabela 7- Recuperações a 3 níveis para a lama seca e húmida.	39
Tabela 8- Incertezas associadas a cada fonte e incerteza global para o método de extração com lama seca.	40
Tabela 9- Concentrações de <i>galaxolide</i> corrigidos pelo valor de recuperação.....	42

Notação e Glossário

a	Declive da regressão linear
ACN	Acetonitrilo
ADBI	<i>Musk celestolide</i>
AHMI	<i>Musk phantolide</i>
AHTN	<i>Musk tonalide</i>
ASE	Extração acelerada por solvente
ATII	<i>Musk traseolide</i>
b	Ordenada na origem
C ₁₈	Sorbente à base de sílica
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CV	Coeficiente de variação ou desvio padrão relativo
DPMI	<i>Musk cashmeran</i>
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa com deteção por espetrometria de massa
GPC	Cromatografia por exclusão de tamanhos
H	Altura do pico cromatográfico
HERA	Avaliação de risco humano e ambiental
HHCB	<i>Musk galaxolide</i>
HPLC-FD	Cromatografia líquida de elevada eficiência com deteção por fluorescência
HRGC	Cromatografia líquida de elevada resolução
HS	<i>Headspace</i>
IFRA	<i>International Fragrance Association</i>
LLE	Extração líquido-líquido
m	Número de medições realizadas
MA	<i>Musk ambrette</i>
MAE	Extração por microondas

MK	<i>Musk ketone</i>
MM	<i>Musk moskene</i>
MS	Espectrometria de massa
MT	<i>Musk tibetene</i>
MW	Microondas
MX	<i>Musk xylene</i>
n	Número de medições
OSPAR	<i>Oslo and Paris Conventions</i>
PCP	Produtos de cuidado e higiene pessoal
PLE	Extração líquida sob pressão
PSA	Amina primária e secundária
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
R	Coeficiente de correlação
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals</i>
s	desvio- padrão
s_a	Erro associado ao declive
s_b	Erro associado à ordenada na origem
SFE	Extração com fluído supercrítico
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SVHC	<i>Substance of very high concern</i>
s_{xo}	desvio- padrão de uma determinada concentração
sy/x	desvio- padrão residual
t	<i>tstudent</i>
U	Incerteza
USE	Extração por ultrassons
vPvB	<i>Very persistant and very bioaccumulative</i>

1 Introdução

Hoje em dia, as fragrâncias sintéticas fazem parte da constituição dos mais variados produtos. Podem ser encontradas em qualquer produto que faça parte da nossa rotina, como por exemplo em perfumes, dentífricos, champôs, loções corporais, sabonetes ou até mesmo em produtos de limpeza doméstica (Roosens *et al.*, 2007). Alguns dos componentes presentes nestes produtos são *musks*, cuja principal função é conferir e fixar os aromas nestes produtos. Os *musks* são pouco solúveis em água e possuem um carácter lipofílico, sendo por isso bioacumulativos. Para além disso, estes compostos são persistentes e apenas parcialmente biodegradáveis (Ritter *et al.*, 1995).

Tal como mencionado anteriormente, os *musks* são incorporados em produtos com elevada incidência de uso. Por esse motivo, estes compostos são continuamente introduzidos no meio ambiente através das lamas e também dos efluentes das estações de tratamento de águas residuais (ETARs). De facto, a maioria das ETARs tradicionais não são capazes de remover eficazmente este tipo de compostos e, por isso, são o principal veículo de contaminação ambiental.

Assim, neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de contaminação das lamas de ETAR pelo *musk* mais utilizado a nível mundial, o *galaxolide*. Pretendeu-se ainda tentar compreender a capacidade bioacumulativa e o comportamento persistente deste *musk* nesta matriz.

1.1 Os *Musks*

Tal como anteriormente referido, os *musks*, também designados por almíscares, são amplamente utilizados em produtos de higiene e de cuidado pessoal (PCPs). Desempenham um papel importante na formulação destes produtos, uma vez que permitem a fixação de fragrâncias, para além deles próprios possuírem aromas. Embora, inicialmente de origem natural, foram suplantados por compostos sintéticos devido a questões éticas e económicas.

1.1.1 *Musks* Naturais

Em tempos antigos, os *musks* naturais eram geralmente utilizados em cerimónias religiosas, como componentes farmacêuticos e afrodisíacos (Mitsui,

1997).O *musk* natural mais conhecido é uma substância extraída das glândulas do veado almiscarado (Pickyhall, 1960). Existem ainda referências a *musks* provenientes de alguns répteis como jacarés e tartarugas, pássaros, insetos e animais marinhos como polvos e moluscos (Theimer, 1982). Outros mamíferos como o gato almiscarado, o boi almiscarado e o rato almiscarado eram também muito utilizados na produção de *musks* naturais (Figura 1).



Figura 1-Animais utilizados na extração de *musks*: a) Veado almiscarado, b) Rato almiscarado, c) Boi almiscarado e d) Gato almiscarado.

Os *musks* naturais também podem ser encontrados em óleos e sementes de algumas plantas, nomeadamente da *Abelmoschus moschatus*, *Angelica archangelica* e *Curcumis Melo* (Figura 2) (Theimer, 1982). Devido ao fato dos *musks* naturais serem obtidos, na sua grande maioria, a partir de uma fonte animal, a sua obtenção era bastante difícil e, por isso, estes eram extremamente caros (Mitsui, 1997). Estas questões, aliadas a outras relacionadas com a preservação das espécies, conduziram a que os *musks* naturais fossem sendo substituídos pelos de origem sintética (Mitsui, 1997).



Figura 2-Plantas utilizadas para a extração de *musks* naturais: a) *Abelmoschus moschatus*, b) *Angelica archangelica*, c) *Curcumis melo*.

1.1.2 *Musks* Sintéticos

Hoje em dia, os *musks* sintéticos são utilizados em diversos produtos como perfumes, sabonetes, loções corporais, cosméticos, amaciadores, detergentes e

ambientadores. Os primeiros *musks* sintéticos foram introduzidos no mercado no início do século passado, substituindo os de origem natural. Devido à sua elevada utilização nos produtos que fazem parte da rotina da sociedade e devido às suas características químicas que induzem a sua persistência, bioacumulação e comportamento lipofílico, os *musks* foram detetados em várias matrizes ambientais e até humanas (tecido adiposo e leite materno) (Hutter *et al.*, 2005). Este tipo de indícios preocupa a comunidade científica e, por isso, recentemente têm sido efetuados estudos que tentam perceber qual o impacto dos *musks* no meio ambiente e no próprio ser humano (Guo *et al.*, 2013). Os *musks* sintéticos podem ser divididos em quatro classes distintas: nitro *musks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e a classe mais recente, os *musks* salicíclicos.

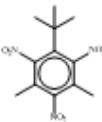
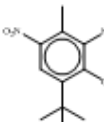
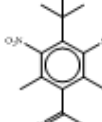
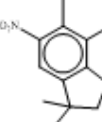
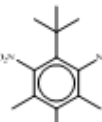
1.1.2.1 Nitro *Musks*

Os nitro *musks* foram descobertos durante estudos na área dos explosivos há cerca de cem anos. Quimicamente, os nitro *musks* são derivados de dinitro e trinitrobenzeno (Rimkus, 1999).

Os compostos mais representativos desta classe são o *muskxylene* (MX), *musk ketone* (MK), *musk tibetene* (MT), *musk ambrette* (MA) e o *musk moskene* (MM). Estes compostos foram muito utilizados na indústria, uma vez que apresentavam características muito similares às do *musks* naturais e um custo de mercado bastante acessível. Hoje em dia, estes compostos são alvo de muita atenção e preocupação uma vez que apresentam riscos para o ambiente e para a sociedade. Diversos estudos demonstraram que o *musk ambrette*, *musk tibetene* e *musk moskene* são compostos com elevada toxicidade. Por essa razão, a sua utilização em cosméticos e produtos de higiene pessoal foi proibida na Europa (Hutter *et al.*, 2005). Outros *musks* como o *musk xylene* e o *ketone* têm a sua utilização restringida pois julga-se que tenham poder carcinogénico (Kenneth, 2009). Dos vários estudos científicos que foram realizados, apenas um deles revelou que a exposição a longo prazo ao *musk xylene* provocava cancro em ratos (Maekawa *et al.*, 1990). Alguns estudos têm demonstrado que os processos sofridos durante o tratamento de água transformam os nitro *musks* em produtos ainda mais problemáticos que os originais (Bester, 2009). Por estes motivos, o *musk xylene* tem vindo a ser utilizado com algumas restrições nos produtos cosméticos. Segundo as normas, estabelecidas pela União Europeia, o *musk xylene* foi provisoriamente autorizado a ser utilizado até 1,0% em fragrâncias finas, 0,4% em *eau de toilette* e 0,03% em outros cosméticos. No caso do *musk ketone*, as

percentagens chegam até aos 1,4% para fragrâncias finas, até aos 0,56% para *eau de toilette* e até 0,042% para outros cosméticos (Comissão Diretiva 2002/34/EC e Comissão Diretiva 2003/14/EC). A IFRA (*International Fragrance Association*) chegou mesmo a proibir o uso do *musk xylene* sustentando a sua decisão com base no impacto que este composto tem no ambiente (IFRA, 2009). Em Outubro de 2008, o *musk xylene*, foi inserido no regulamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*) por ser uma substância que exige maior cuidado e atenção (SVHC - *substance of very high concern*). Segundo este documento, o *musk xylene* é considerado um composto muito persistente e muito bioacumulativo (vPvB - *very persistent and very bioaccumulative*) (ECHA, 2008). Por estas razões, os nitro *musks* têm vindo a ser substituídos pelos *musks* policíclicos. Na Tabela 1 são apresentadas as estruturas e respetivas propriedades físico-químicas dos principais nitro *musks*.

Tabela 1- Estrutura química e propriedades dos principais nitro *musks*.

	<i>Musk xylene</i> (MX)	<i>Musk ambrette</i> (MA)	<i>Musk ketone</i> (MK)	<i>Musk moskene</i> (MM)	<i>Musk tibetene</i> (MT)
CAS	81-15-2 ^a	83-66-9 ^a	81-14-1 ^a	116-66-5 ^a	145-39-1 ^a
Peso Molecular	297 ^a	268 ^a	294 ^a	278 ^a	266 ^a
Estrutura Química					
Log K _{ow}	4,9 ^b	5,7 ^c	4,3 ^b	5,8 ^c	5,9 ^c
Solubilidade em água (mg/L)	0,49 ^b	1,67 ^f	1,90 ^b	0,17 ^d	0,29 ^d
Ponto de ebulição (° C)*	392 ^a	369 ^a	369 ^a	351 ^a	391 ^a
Pressão de vapor (Pa)	3,0×10 ^{-5b}	3,3×10 ^{-3d}	4,0×10 ^{-5b}	11×10 ^{-2e}	76×10 ^{-4e}

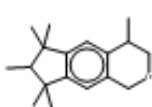
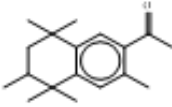
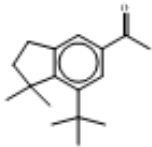
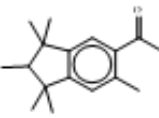
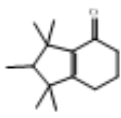
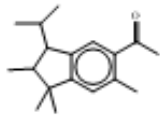
a- cas.ChemNet.com ; b- Chase *et al.* 2002; c- Osemwengie and Steinberg 2001; d- The Good Scents Company, 2012; e- LookChem, 2008; f- Silva, 2013 ; * medido a 760 mmHg

Conforme se pode verificar pela Tabela 1, os *musks* mais solúveis em água são o *musk ambrette* e o *musk ketone* e os *musks* com mais afinidade lipídica são o *musk moskene* e o *musk tibetene*.

1.1.2.2 *Musks* policíclicos

Os *musks* policíclicos são derivados de compostos de tetralina e indano, maioritariamente substituídos por grupos metil (Rimkus, 1999). Alguns dos compostos inseridos nesta categoria são o *tonalide* (AHTN), *galaxolide* (HHBC), *cestolide* (ADBI), *phantolide* (AHMI), *cashmeran* (DPMI) e *traseolide* (ATII). Ainda assim, os mais dominantes no mercado são o HHCB e o AHTN (Bester, 2009). Devido à sua vasta aplicação em produtos de higiene, cosméticos e detergentes, aliada à sua capacidade de se difundirem no meio ambiente e de serem persistentes, o HHCB e o AHTN, têm sido alvo de grande atenção por parte da comunidade científica (Meeuwen *et al.*, 2008). Ambos os compostos podem ser encontrados na lista *OSPAR*, lista de produtos químicos de ação prioritária (HERA, 2004). O AHTN e o HHCB representam cerca de 95% do mercado da União Europeia e 90% do mercado dos Estados Unidos no que diz respeito à utilização de *musks* policíclicos (HERA, 2004). Estudos demonstram que, estes compostos contaminam águas superficiais e que são tóxicos para a vida sub-aquática, chegando mesmo a afetar o desenvolvimento de organismos aquáticos invertebrados (Wollenberger *et al.*, 2003). Recentemente tem sido também discutida a capacidade destes dois compostos inibirem a atividade hormonal. Tanto o HHCB como o AHTN têm vindo a ser apontados como antagonistas em ambos os recetores de progesterona e androgénio, inibindo portanto a atividade hormonal (Schreurs *et al.*, 2005). Na Tabela 2 encontram-se alguns *musks* policíclicos com a sua respetiva estrutura e propriedades físico-químicas.

Tabela 2- Estrutura química e propriedades dos principais *musks* policíclicos.

	<i>Galaxolide</i> (HHCB)	<i>Tonalide</i> (AHTN)	<i>Celestolide</i> (ADBI)	<i>Phantolide</i> (AHMI)	<i>Traseolide</i> (ATII)	<i>Cashmeran</i> (DPMI)
CAS	1222-05-5 ^a	1506-02-1 ^a	13171-00-1 ^a	15323-35-0 ^a	68140-48-7 ^a	33704-61-9 ^a
Peso Molecular	258 ^a	258 ^a	244 ^a	244 ^a	258 ^a	206 ^a
Estrutura Química						
Log K _{ow}	5,9 ^b	5,7 ^b	6,6 ^b	6,7 ^b	8,1 ^b	4,9 ^b
Solubilidade em água (mg/L)	1,75 ^b	1,25 ^b	0,02 ^b	0,03 ^b	0,10 ^b	0,20 ^b
Ponto de ebulição (° C)*	362 ^a	357 ^a	308-309 ^c	3367 ^a	350 ^a	286 ^a
Pressão de vapor (Pa)	7,3×10 ^{-2b}	6,8×10 ^{-2b}	2×10 ^{-2b}	2,4×10 ^{-2b}	1,2 ^b	5,2 ^b

a - cas.ChemNet.com ; b - Chase *et al.*, 2002; c - Cunha, 2012; * medido a 760 mmHg


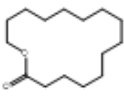
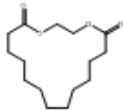
Pela Tabela 2 verifica-se que o *musk celestolide* é o menos solúvel em água e o *musk traseolide* destaca-se pelo seu carácter lipofílico.

1.1.2.3 Musks macrocíclicos

Os *musks* macrocíclicos são cetonas ou lactonas cíclicas com cerca de 10-15 carbonos (Thavaneswaran, 2008). Estes compostos são cada vez mais procurados no mercado, devido às suas características serem muito similares às do *musks* naturais. Além disso, estes compostos têm uma maior capacidade de se biodegradarem do que os nitro *musks* e os *musks* policíclicos (Takaoka, 2007). Outra vantagem destes compostos é o facto de possuírem um odor mais intenso que os *musks* policíclicos, sendo portanto necessária uma menor quantidade para alcançar a mesma *performance* (Vallecillos *et al.*, 2013).

Dentro da classe dos *musks* macrocíclicos os que mais se destacam são o *ambrettolide*, o *exaltolide* e o *ethylene brassylate*. A Tabela 3 apresenta as estruturas e propriedades físico-químicas destes *musks* macrocíclicos.

Tabela 3- Estrutura química e propriedades de alguns *musks* macrocíclicos.

	<i>Ambrettolide</i>	<i>Exaltolide</i>	<i>Ethylene brassylate</i>
CAS	123-69-3 ^a	106-02-5 ^a	105-95-3 ^a
Peso Molecular	252 ^a	252 ^a	256 ^a
Estrutura Química			
Log K _{ow}	5,4 ^b	6,0 ^d	4,7 ^b
Solubilidade em água (mg/L)	0,59 ^b	0,15 ^d	1,70 ^b
Ponto de ebulição (° C)*	399 ^a	379 ^a	464 ^a
Pressão de vapor (Pa)	3,0×10 ^{-3c}	7,0×10 ^{-3d}	5,8×10 ^{-5e}

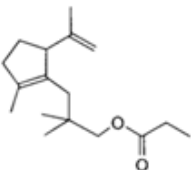
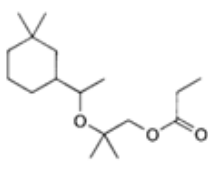
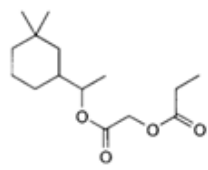
a - cas.ChemNet.com ; b - Ospar Comission, 2004; c - McGinty *et al.*, 2011a; d - McGinty *et al.*, 2011b; e - McGinty *et al.*, 2011c; *medido a 760 mmHg

As propriedades da Tabela 3 demonstram que o *musk* macrocíclico mais solúvel em água é o *ethylene brassylate*. Quanto ao caráter lipofílico, os *musks* macrocíclicos apresentam valores semelhantes, ainda que, o que apresenta um Log K_{ow} mais elevado é o *exaltolide*.

1.1.2.4 *Musks* Alicíclicos

Esta classe de *musks* é bastante recente em relação às outras três anteriormente apresentadas. Apenas em 1975 foi descoberto por Hoffmann e von Fraunberg o primeiro *musk* alicíclico, o *cyclomusk*. Cerca de uma década depois, Giersch e Schulte-Elte deram a conhecer o *helvetolide* e só mais tarde surge o *romandolide* (Eh, 2004). Na Tabela 4 são apresentadas as estruturas e propriedades físico-químicas de alguns *musks* alicíclicos.

Tabela 4- Estrutura química e propriedades de alguns *musks* alicíclicos.

	<i>Cyclomusk</i>	<i>Helvetolide</i>	<i>Romandolide</i>
CAS	84012-64-6 ^a	141773-73-1 ^a	236391-76-7 ^a
Peso Molecular	264 ^a	284 ^a	270 ^a
Estrutura Química			
Log K _{ow}	6,7 ^b	5,5 ^b	6,7 ^b
Solubilidade em água (mg/L)	0,03 ^b	0,30 ^b	0,01 ^b
Ponto de ebulição (° C)*	337 ^a	346 ^a	308 ^b

a - cas.ChemNet.com; b- Silva, 2013

Conforme a Tabela 4 demonstra, a capacidade lipofílica dos *musks* alicíclicos é muito semelhante, com Log K_{ow} entre os 5,5 e os 6,7. Numa análise geral à sua solubilidade em água, os *musks* alicíclicos, são bastante menos solúveis em água do que os *musks* macrocíclicos.

1.2 Detecção de *musks* em matrizes ambientais

Como referido anteriormente, o impacto negativo causado pelos *musks* no meio ambiente e na saúde humana tem vindo a suscitar preocupação entre a comunidade científica e, por isso, têm surgido cada vez mais estudos nesta área. Grande parte dos estudos têm demonstrado que o uso contínuo destes compostos se reflete diretamente nas matrizes ambientais, uma vez que estes são considerados persistentes, acumulando-se ao longo do tempo (Peck, 2006).

O ciclo dos *musks* no meio ambiente tem início com a utilização diária de produtos de higiene e cuidado pessoal bem como produtos de limpeza. Após a sua utilização, parte destes são descarregados nos sistemas de esgotos e serão depois direcionados para as ETARs (Yang e Metcalfe, 2006). Estima-se que cerca de 77% destes compostos sintéticos usados nos produtos de limpeza e nos produtos de higiene pessoal sejam conduzidos para o sistema de esgotos (HERA, 2004). Uma vez nas ETARs, estes compostos não são geralmente eliminados na sua totalidade, uma vez que os tratamentos tradicionais aplicados são, na maioria das vezes, ineficazes

na sua remoção. Assim, parte destes compostos são descarregados para o ambiente através dos efluentes (Zeng *et al.*, 2005). As lamas produzidas nas ETARs são também uma fonte de poluição, uma vez que estas podem ser depositadas em aterro ou utilizadas como fertilizantes em solos agrícolas. Por esta razão, podem contaminar os solos e, por conseguinte, entrar na cadeia alimentar (Wilson *et al.*, 1996). Na verdade, dada a natureza lipofílica dos *musks*, esta será a via de contaminação mais significativa (Guo *et al.*, 2010).

Diversos estudos científicos demonstraram que estes compostos foram detetados em diferentes matrizes ambientais como águas de rio (Villa *et al.*, 2012), águas de mar (Nakata *et al.*, 2012; Nogueroles *et al.*, 2013), solos (Wang *et al.*, 2013) e ar (Kallenborn *et al.*, 1999). Numa análise geral aos estudos realizados sobre a deteção de *musks* nas matrizes ambientais, verificou-se que o HHCB e o AHTN são os mais frequentemente detetados e em concentrações superiores aos restantes *musks*. No caso concreto das águas de rio, as concentrações de HHCB são, normalmente, na ordem das centenas de ng/L (Moldovan, 2006), podendo atingir concentrações na ordem dos µg/L (Villa *et al.*, 2012). Em relação às águas de mar, existem poucos estudos publicados. De um modo geral, estes compostos são detetados em concentrações inferiores às referidas para as águas de rio (0,1 a 5 ng/L) (Berset *et al.*, 1998). A razão para esta diferença estará provavelmente relacionada com o efeito de diluição na água do mar. Os estudos referentes à deteção de *musks* em solo analisam, na sua maioria, solos enriquecidos com biosólidos. Esses estudos apresentam gamas de valores de HHCB muito diferentes, variando entre os ng/g até às centenas de µg/g (Chen *et al.*, 2014; Shek *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2005). O estudo efetuado por Chen *et al.*, 2014 apresenta também valores de HHCB para solos (sem enriquecimento) com concentrações que variam entre 0,7 e 29 ng/g. Em amostras de ar, o HHCB tem sido detetado em concentrações na ordem das décimas dos ng/m³. Ao contrário das águas de rio, águas costeiras e solos, cujos *musks* mais detetados são o HHCB, AHTN e ADBI, nas amostras de ar, para além destes, são também detetados outros *musks* como o MX, MK e ATTI. Contudo, as quantidades detetadas destes últimos compostos são bastante mais baixas (Peck e Hornbuckle, 2006). Perante esta análise generalizada, verificou-se que o HHCB é o *musk* predominante na maioria das matrizes ambientais. Devido às suas características físico-químicas, aliadas à sua elevada utilização e deteção no meio ambiente, o HHCB foi o *musk* escolhido para este estudo.

1.3 Percurso dos *musks* numa ETAR

As águas residuais, que chegam a uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR), têm na sua composição matéria orgânica e mineral, constituindo assim a matriz ideal para a deteção de compostos orgânicos como os *musks*. Como já foi referido anteriormente, as descargas de esgoto são a principal fonte de *musks*.

O objetivo de uma ETAR é, portanto, a separação da matéria sólida existente nas águas a tratar e a redução da carga orgânica contida nestas, para mais tarde poder ser descarregada no meio ambiente. O processo de tratamento pode variar consoante o tipo de ETAR, mas existe um conjunto de etapas que são comuns a todas elas. Geralmente o processo inicia-se por um tratamento preliminar consistindo numa gradagem do afluente para separar sólidos mais grosseiros e uma tamisagem para separar sólidos de dimensões inferiores. Seguidamente ocorre o tratamento primário onde os sólidos suspensos vão sedimentar num decantador. A etapa que se segue é o tratamento secundário, usualmente num tanque/reator, onde ocorre o tratamento biológico. O tratamento mais comum é o tratamento por lamas ativadas, onde a matéria orgânica é consumida pela atividade dos microrganismos aeróbios. Além deste tratamento, existem outros como por exemplo, tratamento em leitos percoladores e degradação anaeróbica. Após o tratamento secundário, em algumas ETARs ainda existe um tratamento adicional (tratamento terciário) baseado em processos físico-químicos para remover principalmente fósforo e azoto (Spellman e Bieber, 2012). Após esta fase o efluente está pronto a ser descarregado no meio ambiente. Os poluentes de grande carácter lipofílico podem não ser degradados na totalidade, migrando para as lamas resultantes das fases do tratamento preliminar, primário, secundário e terciário e por isso é muito importante proceder ao tratamento das mesmas. De uma forma geral, as lamas são direcionadas para o processo de espessamento cujo objetivo é concentrar os sólidos existentes pela remoção da água. Ainda antes de seguir para o seu destino final, a lama, sofre um tratamento de estabilização por ação de microrganismos anaeróbios, reduzindo os agentes patogénicos e é desidratada para reduzir ainda mais o seu teor em água (Sperling, 2007). Após a estabilização e desidratação da lama é esperado que a concentração da carga poluente presente seja pouco significativa. Prevê-se que o destino privilegiado das lamas seja a deposição em aterros, seguida da reutilização para fertilização de campos agrícolas. A incineração não constitui uma alternativa muito favorável uma vez que produz cinzas (Sousa, 2005). Na Figura 3 é apresentado um fluxograma representativo do funcionamento de uma ETAR convencional.

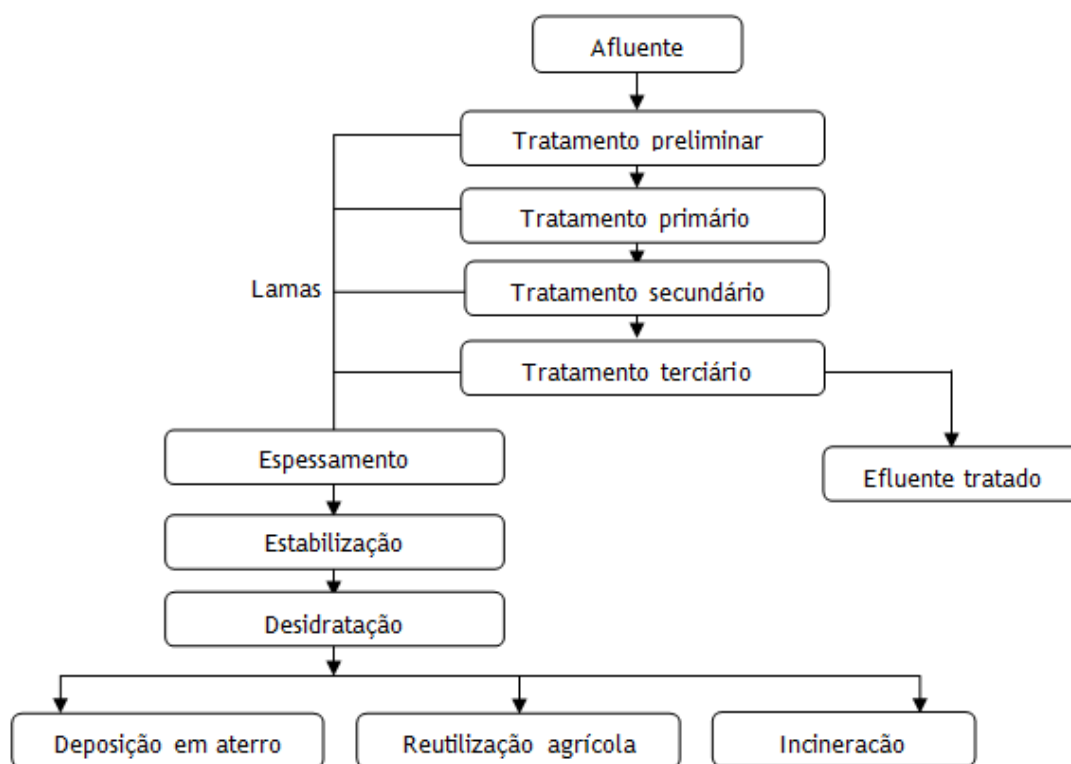


Figura 3- Fluxograma representativo do funcionamento de uma ETAR.

No caso particular dos *musks*, as duas grandes vias de remoção são a adsorção pela lama e a degradação biológica, embora existam também tratamentos terciários onde pode também ocorrer degradação química (Ren *et al.*, 2013). Estudos, como o de Salgado *et al.*, 2012 demonstram que o nível de adsorção por parte das lamas é alto (>75%), mas a remoção de *musks* por biodegradação é baixo (<25%). Outro tratamento referido por estes autores é a radiação UV, obtendo-se percentagens de remoção entre os 25 e os 75%. Existem ainda autores que defendem que embora a radiação UV reduza os níveis de *musks* sintéticos, também os transforma em compostos mais tóxicos do que os originais (Jenkins *et al.*, 2007). Contudo, existem diversos estudos que demonstram que compostos orgânicos como os *musks* conseguem prevalecer mesmo após todos estes tratamentos (Hu *et al.*, 2011). A afinidade lipídica que os *musks* têm, conduz a que estes compostos prevaleçam nas lamas, já que é estimado que cerca de 50 a 60% dos sólidos secos das lamas seja matéria orgânica (LeBlanc *et al.*, 2006). Apenas nos últimos anos, os *musks* têm sido abordados como compostos potencialmente problemáticos e, por isso, cada vez mais os estudos visam avaliar a sua persistência bem como o impacto que podem ter no meio ambiente. Assim torna-se importante avaliar as quantidades destes

contaminantes nas lamas para posteriormente se poder aperfeiçoar os tratamentos e tentar interromper o ciclo de contaminação.

1.4 Técnicas de Extração, *Cleanup* e Análise

Para ser possível a análise de uma amostra de lamas é necessário proceder inicialmente a uma extração dos analitos de interesse e *cleanup* do extrato resultante. Posteriormente, efetua-se a análise instrumental de modo a avaliar o conteúdo da amostra, isto é, identificar e/ou quantificar um ou mais compostos presentes na amostra. No caso em estudo pretende-se apenas quantificar o *musks galaxolide*.

1.4.1 Métodos de extração e *cleanup*

O objetivo da técnica de extração é a separação dos compostos desejados da matriz. Esta é a fase onde é consumido mais tempo e é também aquela que pode originar mais erros.

Os métodos de extração para a análise de *musks* variam consoante a matriz e, por isso, a sua escolha vai interferir no resultado final (Morris, 2010; Akoh e Min, 2002; William e Christie, 1982). Outro aspeto importante a considerar na escolha do método de extração é o económico. Os processos de extração tradicionais, como a extração líquido-líquido (LLE), extração sólido-líquido (por exemplo, Soxhlet) e a extração em fase sólida (SPE) utilizam uma elevada quantidade de solventes orgânicos e, por isso, são processos muito dispendiosos (Huie, 2007; López *et al.*, 2007). No caso específico deste trabalho, o objetivo é a extração do *galaxolide* das lamas provenientes de uma ETAR.

Para a extração de *musks* de lamas, os métodos mais utilizados são os que recorrem a Soxhlet (Shek *et al.*, 2008), extração por ultrassons (USE) (Ternes *et al.*, 2005), extração em fase sólida (SPE) (Zhou *et al.*, 2009), extração líquida sob pressão (PLE) (Ternes *et al.*, 2005), extração por microondas (MAE) (Smyth *et al.*, 2007) e extração acelerada por solvente (ASE) (Guo *et al.*, 2010). No estado da arte será apresentada uma tabela referente a este assunto com informação mais detalhada.

1.4.1.1 Métodos de extração com solvente

A extração por solvente refere-se a qualquer método que envolva o contato entre a matriz e um solvente, normalmente orgânico. Métodos como extração por Soxhlet, o ASE ou LLE são alguns exemplos de métodos de extração por solvente.

A extração por Soxhlet (Figura 4) é um método de extração sólido-líquido. Neste processo, uma amostra sólida é colocada dentro de um suporte poroso (normalmente dentro de um cartucho de celulose) e introduzido no interior do extrator. No balão é colocado um solvente orgânico apropriado, que é aquecido por meio de uma placa ou manta de aquecimento. O solvente aquecido evapora até um condensador e, ao contactar com este, arrefece e condensa. Este solvente, no processo de descida até ao balão irá contactar com a amostra, extraíndo os analitos. Este processo repete-se até se obter o extrato final. Esta metodologia é simples e permite a obtenção de elevados rendimentos mássicos (Castro e Capote, 2010).



Figura 4- Montagem de uma extração em Soxhlet (retirado de <http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic41-03-006.html>)

O ASE (Figura 5) é um método que combina altas pressões e temperaturas com o intuito de aumentar a eficiência da extração. Enquanto que altas temperaturas estimulam a cinética da extração, a alta pressão permite que o solvente permaneça no seu estado líquido, aumentando assim a velocidade e a eficiência da extração. A amostra, sólida ou semi-sólida, é introduzida numa célula onde, posteriormente, contata com o solvente aquecido. O azoto é usado para arrastar o extrato para o *vial* de recolha (Pawliszyn, 2002; Raaman, 2006; Kettle, 2013).



Figura 5- Equipamento utilizado na extração por ASE (retirado de <http://www.dionex.com.br/?p=texto.asp&c=analitica>)

O USE é um método de extração que consiste na utilização da energia de ultrassons, através de cavitação acústica. Na prática, esta metodologia baseia-se na formação de bolhas de gás e na sua implosão, o que resulta num aumento de temperatura e de pressão. Consequentemente, o aumento da temperatura irá aumentar a difusividade e a solubilidade dos compostos, enquanto o aumento da pressão irá ajudar o solvente a penetrar na matriz, ajudando na sua extração. Esta técnica pode ser aplicada por meio de sondas ultra sónicas ou por banho de ultrassons (Guardia e Garrigues, 1996).

A extração com fluido supercrítico (SFE) é baseada na interação de um fluido supercrítico com a matriz. O fluido diz-se supercrítico quando atinge a temperatura e a pressão crítica, acima das quais a substância passa a ter propriedades intermédias entre um gás e de um líquido. A extração dá-se principalmente devido ao elevado coeficiente de difusão do fluido supercrítico, que geralmente é o dióxido de carbono (King e List, 1996). Na prática, o dióxido de carbono é pressurizado acima do ponto crítico e entra na câmara de extração com o auxílio de uma bomba. Na câmara de extração, que é aquecida até ou acima da temperatura crítica, os analitos orgânicos dissolvem-se no dióxido de carbono e são arrastados para um coletor. Já no coletor, a pressão toma o valor da pressão atmosférica, o dióxido de carbono volta ao seu estado gasoso e os compostos que foram separados permanecem no coletor (Patnaik, 2010). Para extrair os compostos do coletor faz-se passar um solvente apropriado, como por exemplo a acetona (Smyth *et al.*, 2007).

Após realizar a extração é importante prosseguir com o *cleanup*, que tem como objetivo remover a maioria dos interferentes presentes no extrato. Entre os métodos de *cleanup* mais usuais, como será discutido com maior pormenor no estado da arte, ressalta-se a cromatografia de permeação em gel (GPC). O GPC baseia-se na separação dos compostos com base na sua massa molecular (Meehan, 2006). Este método é ideal na separação de lípidos, polímeros, proteínas, resinas naturais, componentes celulares e outros compostos de grande peso molecular (Gilson, 2013). O sistema mais comum é no formato de colunas, cujo enchimento consiste num gel, *biobeads*, que correspondem a cadeias interligadas de polímeros de poliestireno. Este enchimento irá reter as moléculas de menor peso molecular (dentro de uma determinada gama de valores) e, pela força gravítica, irá libertar as outras (Bio-Rad Laboratories).

O SPE, para além de ser considerado um método de extração, também pode ser aplicado como método de *cleanup* - método combinado (Figura 6). O método consiste em fazer passar um extrato líquido por um cartucho ou coluna que contém

um sorvente, cuja função é adsorver os compostos que se pretende extrair ou os interferentes. A escolha do adsorvente é feita de acordo com o composto que se deseja extrair, conforme a afinidade que apresenta para os analitos. Seguidamente é introduzido um solvente apropriado e, dada a afinidade que este tem para os compostos que se pretende extrair, vai arrastá-los (Dean, 2009).



Figura 6- Montagem de SPE (retirado de <http://www.teknokroma.es/en/Productos/filtration-and-extraction/6/solid-phase-extraction-spe/106/433/vacuum-manifold.aspx>)

Neste trabalho, um método diferente dos apresentados até ao momento será utilizado. Tal como o SPE, a metodologia de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) combina a técnica de extração e de *clean-up*. O método é bastante comum na extração de pesticidas e foi Anastassiades *et al.* (2003) que o desenvolveu. Várias são as vantagens apontadas a este método, entre elas, as altas percentagens de recuperação (acima dos 85%) e o fato de não depender de muito solvente (Vidal e Frenich, 2006).

O primeiro passo deste método consiste na extração da amostra com um solvente orgânico, normalmente o acetonitrilo (ACN), em ultrassons (Mastovska e Lehotay, 2004). Seguidamente, o extrato é misturado com sais anidros ou tampões, como o sulfato de magnésio (MgSO_4) e/ou o cloreto de sódio (NaCl). Este é o passo que proporciona a partição, ou seja, estes sais vão reduzir a solubilidade dos compostos alvos na água e conseqüentemente, esses compostos vão migrar para a fase orgânica (Homem *et al.*, 2013; Stan, 2000; Pizzutti *et al.*, 2007). De seguida o extrato é centrifugado e o sobrenadante é recolhido. Este sofrerá um *cleanup* recorrendo ao método SPE dispersivo, isto é, extração dispersiva em fase sólida. Este método de *cleanup* é baseado na eliminação de interferentes recorrendo a um polímero contendo aminas primárias e secundárias, o PSA, e à sílica (C_{18}). O C_{18} é indicado para remover interferentes apolares como os lípidos e ceras e o PSA para remover ácidos orgânicos polares, pigmentos, açúcares e ácidos gordos (Georgakopoulos *et al.*, 2011; Wilkowska e Biziuk, 2011).

1.4.1.2 Métodos de extração sem solvente

A microextração em fase sólida (SPME), tal como o SPE, funciona também como um método combinado de extração/*cleanup*. Este método não requer o uso de solvente e funciona como uma técnica de concentração de analitos voláteis ou semi-voláteis. O equipamento de SPME (Figura 7) utiliza um suporte em forma de seringa que contém no seu interior uma agulha, que por sua vez protege a fibra de sílica revestida por um material polimérico. O material que reveste essa fibra é escolhido de acordo com a polaridade dos compostos. A extração pode ocorrer de duas formas, introduzindo a fibra no espaço vazio existente entre a amostra sólida e o topo do *vial* (*headspace*) ou submergindo a fibra na matriz aquosa (imersão). Em ambos os casos a extração dá-se pela adsorção dos analitos pela fibra com base no equilíbrio entre as fases. Posteriormente, a fibra, é introduzida diretamente no compartimento aquecido do equipamento de cromatografia gasosa para se proceder à dessorção e análise dos compostos (Pawliszyn, 2012; www.sigmaaldrich.com).



Figura 7- Equipamento de SPME. (Retirado de <http://analisisvinicos.com/spme.php.htm>)

1.4.2 Metodologia de análise do *galaxolide*

Após a extração/*cleanup* procede-se à análise dos compostos presentes na amostra. Os métodos instrumentais são métodos usados para determinar a composição da amostra. O método instrumental mais utilizado na análise de *musks* em águas residuais, sedimentos, atmosfera e lamas é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (Hu *et al.*, 2011; Sumner *et al.*, 2010; Regueiro *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007; Horii *et al.*, 2007; Ternes *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005). No entanto, neste trabalho o método analítico utilizado baseia-se na cromatografia líquida (HPLC) com deteção por fluorescência.

1.4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Entre os métodos de separação mais comuns destaca-se a cromatografia. O russo, Mikhail Tswett é considerado o fundador da cromatografia embora antes dele haja registos de algumas experiências pioneiras de outros investigadores. Esta técnica requer a utilização de uma fase estacionária, que compõe a coluna cromatográfica, e de uma fase móvel, que transporta a amostra ao longo da coluna cromatográfica (Pombeiro, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das vertentes da cromatografia, e provavelmente a mais versátil, usada na separação, identificação e quantificação de espécies químicas. No caso da cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido e a fase estacionária consiste numa coluna empacotada com partículas inertes (Skoog e Holler, 2000). O equipamento de HPLC é constituído pelo sistema de bombagem, sistema de injeção da amostra, pré-coluna, coluna analítica, detetor e interface. Na Figura 8 apresenta-se um esquema representativo de um sistema de HPLC.

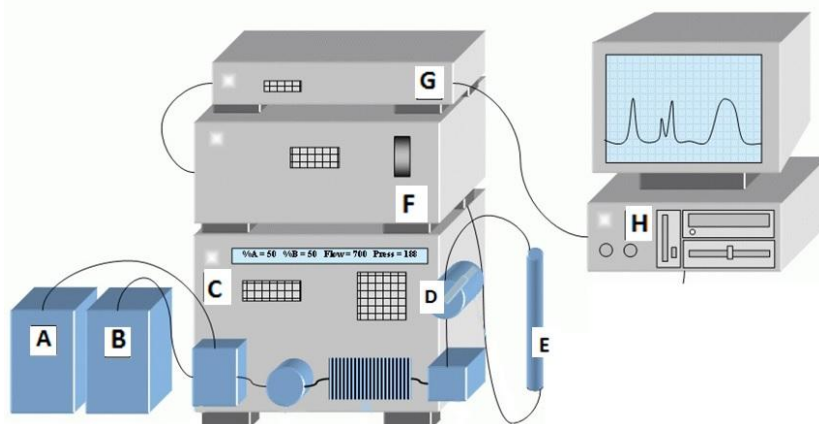


Figura 8- Esquema representativo de um sistema de HPLC: A e B - Fase Móvel, C- Sistema de bombagem, D- Sistema de Injeção, E- Pré-coluna e coluna, F- Detetor, G- Interface, H- Sistema de aquisição de dados (Adaptado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif>).

O sistema de bombagem tem como objetivo manter constante a entrada de eluente e, para isso, a bomba deve dispor de uma capacidade de cerca de 3 mL/min para uma pressão de entrada entre 30 a 70 atm. Os tipos de bomba mais comuns são bombas mecânicas ou pneumáticas (Pombeiro, 2003). Para se proceder à injeção da amostra é necessário dispor de uma solução que constitua a fase móvel. Essa solução deve ser compatível com a fase estacionária, escolhida de acordo com o tipo de detetor e os solventes em questão devem ter um elevado grau de pureza. A compatibilidade com a fase estacionária está relacionada sobretudo, com a polaridade dos compostos, ou seja, a capacidade dos compostos eluírem depende da polaridade dos mesmos (Pombeiro, 2003). Além destas especificações, a fase móvel

deve ser filtrada e desgaseificada antes da sua utilização (Skoog *et al.*, 2006). Geralmente a amostra é introduzida no compartimento de injeção com o auxílio de uma micro-seringa e, através de um sistema de válvulas, é conduzida até à coluna. O sistema de injeção mais comum é o manual, que dispõe de uma válvula que permite a introdução de volumes precisos de amostra através de um *loop* (tubo calibrado). Este sistema tem duas posições, *load* e *inject*. Na posição *load*, a válvula que faz a ligação à coluna permanece fechada. Como se pode ver na Figura 9a), com o posicionamento do injetor no *load*, é possível introduzir um volume rigoroso de amostra com o auxílio da seringa e a fase móvel é direcionada diretamente da bomba para a coluna, sem passar pelo *loop*. Quando acionada a posição *inject*, a válvula de ligação do *loop* à coluna é aberta e a amostra é conduzida até à coluna através da fase móvel (Figura 9b) (Skoog *et al.*, 2006).

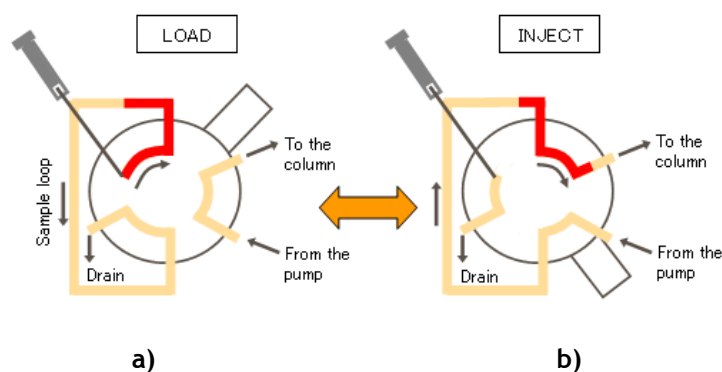


Figura 9- Injetor de válvula: a) posição de carga "load", b) posição de injeção "inject" (retirado de http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_3.html).

A pré-coluna é um elemento que antecede a coluna analítica, cujo objetivo é impedir que algumas partículas fiquem retidas nos primeiros centímetros da coluna (Pombeiro, 2003). A coluna analítica é então percorrida pela fase móvel, que arrasta a amostra, e permanece em contato com a fase estacionária que é composta por partículas porosas. Esta é a fase onde ocorre a separação dos compostos dependendo da afinidade que estes têm para com a fase estacionária. A afinidade é baseada na polaridade dos compostos, ou seja, fases estacionárias polares vão reter os compostos polares e consequentemente estes irão eluir mais tarde (Dong, 2006).

A função do detetor é monitorizar a resposta do sistema. Existem vários tipos de detetores, sendo que a escolha do detetor varia consoante as propriedades dos compostos a analisar (McMaster, 2007). No trabalho em causa, o detetor utilizado é o de fluorescência uma vez que o *galaxolide* tem a capacidade de fluorescer. Os átomos ao serem excitados, num determinado comprimento de onda, emitem um sinal luminoso e é a intensidade dessa fluorescência que é registada pelo detetor. O

resultado gráfico é designado por cromatograma. Neste é representada a intensidade do sinal em função do tempo (David e Moldoveanu, 2013). O tempo de retenção corresponde ao tempo que um certo composto demora a atravessar a coluna. Mais uma vez, este depende das características da fase móvel e da fase estacionária. Uma das grandes vantagens do detector de fluorescência é a sua alta sensibilidade e selectividade, sendo frequentemente utilizados na análise de fármacos, produtos naturais e de derivados de petróleo (Dong, 2006).

O sistema de aquisição de dados é baseado num *software* que regista o sinal do detetor e o traduz sob a forma de um cromatograma (intensidade de sinal em função do tempo da corrida cromatográfica) - (Figura 10).

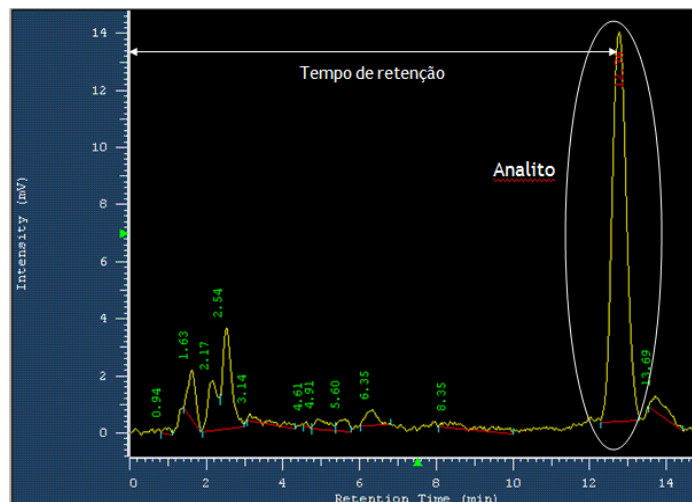


Figura 10- Exemplo de um cromatograma.

2 Estado da Arte

Nesta secção são apresentados os principais estudos realizados sobre a deteção de *musks* em lamas de ETAR. A temática dos *musks* é bastante recente e, por isso, apenas nos últimos anos surgiram estudos sobre estes compostos nesta matriz. Como foi referido anteriormente, os *musks* têm capacidade de se bioacumular, principalmente na matéria lipídica. Por isso, torna-se importante avaliar a sua existência nas lamas, uma vez que detêm uma grande percentagem de matéria orgânica. Ainda neste tópico serão apresentados e analisados os métodos de extração e *cleanup*, bem como os métodos de análise. Além destes procedimentos serão também apresentadas as concentrações e os limites de deteção para cada estudo.

2.1 Deteção de *galaxolide* em lamas de ETAR

Conforme foi referido anteriormente, as lamas reúnem as condições ideais para que compostos orgânicos como os *musks* se acumulem, uma vez que grande parte da sua composição consiste em matéria orgânica. Numa análise geral aos estudos apresentados na Tabela 5 e que se focam na deteção do *galaxolide* em lamas de ETAR, verifica-se que este foi detetado em elevadas quantidades, com concentrações que variaram entre os 1,4 (Wu e Ding, 2010) e os 565670 ng/g (Chen *et al.*, 2007).

Herren e Berset (2000) analisaram a lama bruta existente nos esgotos e que é conduzida até às ETARs. Este estudo incidiu em amostras de três diferentes tipos de ETAR: estações que recolhem apenas amostras de esgoto doméstico e estações que recolhem esgoto doméstico, escoamentos de águas pluviais e pequenas quantidades de esgoto industrial e estações que recolhem efluentes semelhantes ao anterior, mas com elevadas quantidades de esgoto industrial. A análise das diferentes amostras foi realizada através de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (HRCG-MS/MS), onde foi possível detetar o HHCB com concentrações médias de 5991,2 ng/g, 3361,7 ng/g e 3103,0 ng/g para o esgoto doméstico, combinação de esgoto doméstico com águas pluviais e esgoto fundamentalmente industrial, respetivamente. O facto de as concentrações de HHCB no esgoto doméstico serem superiores às amostras combinadas de esgoto doméstico com industrial dever-se-á, provavelmente, ao facto destas indústrias não estarem

ligadas a qualquer tipo de atividade que envolva produtos com fragrâncias, acabando por ocorrer apenas diluição do efluente doméstico. Pelo mesmo motivo, quando comparado o esgoto combinado contendo elevada quantidade de efluentes domésticos com o que contém elevada quantidade de efluente industrial, é possível verificar que o que contém elevada quantidade de efluente doméstico possui uma concentração média de HHCB superior. À semelhança deste estudo com lamas brutas, foram também realizados mais dois por Zeng *et al.* (2005) e Yang e Metcalfe (2006). Zeng *et al.* (2005) estudaram as lamas brutas provenientes de três sistemas de esgotos: combinação de esgoto doméstico e industrial, lamas de uma indústria de produtos de limpeza e higiene pessoal e lamas de uma indústria alimentar. As amostras do sistema de esgoto combinado apresentaram concentrações médias de 10762 ng/g, as provenientes da empresa de produtos de limpeza e higiene pessoal 367900 ng/g e a proveniente da indústria alimentar 82 ng/g. As concentrações de HHCB nas amostras de esgoto proveniente de produtos de higiene pessoal foram significativamente superiores às amostras dos outros dois tipos de esgoto. Também é expectável que as concentrações de HHCB nas amostras de lama provenientes de um esgoto de produtos de higiene pessoal sejam maiores que as de uma indústria alimentar, uma vez que esta última, provavelmente, não utiliza *musks* na confeção dos seus produtos. No caso do estudo de Yang e Metcalfe, 2006 foram analisadas amostras de lamas brutas provenientes, maioritariamente, de esgoto doméstico. Neste caso as concentrações médias de HHCB rondaram os 3302,5 ng/g. Fazendo uma comparação entre estes estudos, verifica-se que os valores das concentrações de HHCB de Herren e Berset (2000) e de Yang e Metcalfe (2006) apresentam a mesma ordem de grandeza. Os valores das concentrações destes dois estudos em relação ao de Zeng *et al.* (2005) apresentam alguma discrepância mas tal pode ser explicado pelos diferentes hábitos e rotina das populações ou até mesmo o número de pessoas que servem estas ETARs.

Conforme se pode ver na Tabela 5 apenas Lv *et al.* (2010) e Wu e Ding (2010) fazem referência a lamas provenientes do tratamento preliminar. Ainda assim os valores médios da concentração dos dois estudos diferem significativamente. Lv *et al.* (2010) apresenta um valor médio de 1846,8 ng/g para o processo de separação de areias e gorduras e Wu e Ding (2010) um valor médio de 1,4 ng/g. Esta grande diferença entre os valores pode estar relacionada com alguns fatores, como por exemplo a proveniência do esgoto afluente ser industrial no caso de Lv *et al.* (2010) (cerca de 30%) e no caso de Wu e Ding (2010) ser apenas doméstico. No estudo de Lv *et al.* (2010) não é referido o tipo de indústria em causa mas caso seja uma indústria

que utilize fragrâncias na sua produção pode alterar o valor da concentração média de HHCB significativamente. Outro fator que é importante referir é a localização dos estudos, o de Lv *et al.* (2010) realizado na China e o de Wu e Ding (2010) em Taiwan.

Os autores que estudaram a presença de HHCB nas lamas provenientes do tratamento primário foram Llompart *et al.* (2003), Smyth *et al.* (2007), Chen *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008), Lv *et al.* (2010) e Wu e Ding (2010). O estudo que apresenta concentrações de HHCB mais elevadas é o de Chen *et al.* (2007), com uma média de 512450 ng/g. Estes autores recorreram a extrações por Soxhlet e obtiveram percentagens de recuperação bastante elevadas, cerca de 107%. O estudo de Smyth *et al.* (2007), realizado no Canadá, também apresentou valores de concentração de HHCB bastante altos em relação aos outros estudos. O método de extração utilizado foi o SFE para as amostras de lamas que secaram ao ar ambiente e o MAE para as amostras que foram centrifugadas, com percentagens de recuperação de 88% e 86%, respetivamente. Na verdade o método de secagem pode também influenciar muito o resultado final, uma vez que a secagem ao ar ambiente pode conduzir à evaporação dos compostos. Este estudo apresentou concentrações médias de HHCB, nas lamas primárias, de 21550 ng/g para as lamas que secaram ao ar ambiente e de 28300 ng/g para as lamas que apenas foram centrifugadas ou filtradas.

Shek *et al.* (2008), tal como Chen *et al.* (2007), utilizaram o método de extração por Soxhlet, obtendo igualmente percentagens de recuperação bastante elevadas ($\approx 100\%$). Ainda assim, as concentrações de HHCB detetadas não foram tão elevadas (média de 8000 ng/g) como as de Chen *et al.* (2007), mas na ordem de grandeza das determinadas por Lv *et al.* (2010) (média de 3005 ng/g). Ainda que a ordem de grandeza da concentração média de HHCB difira um pouco entre estes 4 estudos, são os que detêm os valores mais altos, sendo que todos foram realizados na China, exceto o de Smyth *et al.* (2007). Esta é a razão que pode explicar os elevados valores de HHCB detetados, ou seja, a influência dos hábitos populacionais consoante a localização do estudo.

Uma grande parte dos autores, como Llompart *et al.* (2003), Kupper *et al.* (2004), Berset *et al.* (2004), Ternes *et al.* (2005), Smyth *et al.* (2007), Horri *et al.* (2007), Chen *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008), Lv *et al.* (2010) e Yang e Metcalfe (2006) estudaram as lamas provenientes do tratamento secundário das ETARs. Ainda que todas estas lamas provenham do tratamento secundário é importante referir que alguns desses tratamentos podem envolver lama ativada e outros não. Estudos como o de Llompart *et al.* (2003) não especificam qual o tipo de tratamento secundário. Já os estudos de Chen *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008), Berset

et al. (2004), Smyth *et al.* (2007), Horri *et al.* (2007) e Ternes *et al.* (2005) referem-se ao tratamento secundário por lamas ativadas. Kupper *et al.* (2004) apresenta dois tipos de tratamento para 2 ETAR's diferentes, ambos com o princípio de lamas ativadas: a primeira com um tratamento primário (clarificador) seguido de um tanque de arejamento com clarificador secundário e a outra por arejamento prolongado, que dispensa o tratamento primário. Mais uma vez, Chen *et al.* (2007) são os autores que apresentam o valor médio de concentração de HHCB mais elevado, 565670 ng/g. Os fatos que explicam o valor médio bastante elevado são os mesmos que foram referidos na análise da lama primária, pode estar relacionado com o número de pessoas que a ETAR serve e os próprios hábitos da população. Os estudos de Shek *et al.* (2008) e de Horri *et al.* (2007) são os que apresentam valores médios de concentração de HHCB mais próximos, 22000 e entre 12800 ng/g (Kentucky) e 39000 ng/g (Georgia), embora sejam realizados em países diferentes. Smyth *et al.* (2007) apresenta valores médios de concentração de HHCB para as lamas secas ao ar ambiente, cerca de 22150 ng/g e para as lamas centrifugadas, cerca de 59500 ng/g. Tal como aconteceu com as lamas primárias, as lamas que são secas ao ar ambiente apresentam valores bastante inferiores aos das lamas centrifugadas muito provavelmente porque haverá uma perda por volatilização do HHCB. Também Kupper *et al.* (2004) apresenta valores médios muito semelhantes 20500 ng/g (arejamento convencional) e 20900 ng/g (arejamento prolongado). Zhou *et al.* (2009) também analisou lamas de ETARs diferentes, com processos diferentes de tratamento secundário. O valor médio de concentração de HHCB apresentado neste estudo, para o processo de arejamento prolongado, foi de 14900 ng/g, que se enquadra na ordem de grandeza do estudo mencionado anteriormente.

No estudo de Kupper *et al.* (2004), comparando os diferentes tipos de tratamento secundário (arejamento convencional e prolongado), é possível constatar que ambos apresentam concentrações médias de HHCB muito semelhantes (20900 e 20500 ng/g), o que, apenas analisando estes dados, não permite concluir qual deles será mais vantajoso. Berset *et al.* (2004), Ternes *et al.* (2005) e Yang e Metcalfe (2006) apresentam valores médios de concentração de HHCB muito semelhantes, 4300 ng/g e 6000 ng/g e 3309,9 ng/g respetivamente. No caso de Berset *et al.* (2004) e Ternes *et al.* (2005) dever-se-á muito provavelmente porque ambos foram realizados na Suíça e consequentemente a população que serve a ETAR segue o mesmo padrão de estilo de vida. Lv *et al.* (2010) apresenta também valores de concentrações de HHCB das lamas recolhidas do clarificador secundário, 3380 ng/g. Um aspeto importante a referir sobre este estudo é o fato de ser um reator a anteceder o clarificador

secundário e não um arejador, como no estudo de Kupper *et al.* 2004, não sendo possível estabelecer uma comparação lógica entre os valores destes dois estudos. Além da ETAR com tratamento secundário por arejamento prolongado, Zhou *et al.*(2009) também apresenta um valor médio para lamas provenientes de um reator do tratamento secundário de outra ETAR, com um valor muito semelhante ao de Lv *et al.*(2010), de 7800 ng/g. Ainda assim, a comparação de estudos como o de Lv *et al.*(2010), Zhou *et al.*(2009) e Kupper *et al.*(2004) não pode ser apenas fundamentada no tipo de tratamento secundário. O tipo de afluente é também diferente para cada um, no estudo de Kupper *et al.*(2004) com grande influência de uma indústria de artesanato e Lv *et al.*(2010) também com influência industrial (cerca de 30%), embora não seja especificado o tipo de atividade. Ambos os estudos provêm de países diferentes, o que também não permite estabelecer nenhum tipo de comparação mais específica.

Outros autores que também analisaram lamas primárias e secundárias, embora não fazendo uma clara distinção entre elas, foram Guo *et al.*(2010). A abordagem deste estudo foi diferente uma vez que os autores analisaram uma mistura de lamas desidratadas do tratamento primário e secundário provenientes de três tipos diferentes de esgoto. Os tipos de esgoto analisados foram doméstico, proveniente de uma indústria farmacêutica e de uma atividade pecuária, sendo as concentrações médias de HHCB detetadas de 47900 ng/g, 9090 ng/g, 2398ng/g, respetivamente. Comparando os três tipos de esgoto é possível verificar que os valores mais elevados de HHCB são detetados para o esgoto doméstico e para a indústria farmacêutica. A razão estará provavelmente relacionada com o fato de a indústria farmacêutica lidar com produtos que contenham fragrâncias. Em relação à concentração média de HHCB do esgoto doméstico, é expectável que seja superior à de uma atividade pecuária, que dificilmente utilizará produtos que contenham *musks* na sua composição.

Como foi referido na introdução deste trabalho, nem todas as ETARs realizam tratamentos terciários e, por isso, a grande maioria dos estudos apresentados na Tabela 5 abordam apenas os tratamentos primários e secundários. No entanto, existem dois estudos realizados por Zhou *et al.* (2009) e Shek *et al.*(2008) que apresentam valores para as concentrações de HHCB nas lamas provenientes do tratamento terciário. Contudo a diferença na ordem de grandeza dos resultados apresentados é bastante significativa. Zhou *et al.*(2009) apresenta concentrações médias de HHCB de lamas proveniente do tratamento de remoção de fósforo e azoto de 4700 ng/g, enquanto que no estudo de Shek *et al.*, 2008 o valor médio é de 45000

ng/g. Ainda assim, os autores não especificam o tipo de tratamento terciário, que para além de tratamentos como a remoção de fósforo e azoto pode consistir também em filtração, cloração ou outros.

Além de estudarem as concentrações de HHCB nas lamas secundárias, Ternes *et al.* (2005), Horri *et al.* (2007), Lv *et al.* (2010) e Yang e Metcalfe (2006) também analisaram lamas provenientes do sistema de tratamento de lamas. No estudo de Ternes *et al.* (2005) e Yang e Metcalfe (2006) o tratamento de lamas é realizado por digestão anaeróbia, no estudo de Horri *et al.* (2007) sabe-se que a lama é espessada e desidratada e no de Lv *et al.* (2010) os autores fazem apenas referência ao condicionamento e desidratação da mesma. Ainda assim, comparando os resultados dos estudos de Ternes *et al.* (2005) e de Horri *et al.* (2007) é possível verificar que os valores médios são bastante semelhantes, 15000 ng/g e entre 7500 e 14000 ng/g, respetivamente. Embora não seja descrita uma fase de tratamento por digestão anaeróbia no estudo de Horri *et al.* (2007), o valor médio de concentração de HHCB da lama proveniente da etapa de desidratação, de ambas as ETAR deste estudo, não difere muito do valor médio do estudo de Ternes *et al.* (2005). O valor médio do estudo de Lv *et al.* (2010) é de 3409,2 ng/g, sendo da mesma ordem de grandeza dos anteriores. O estudo de Yang e Metcalfe (2006), após a etapa de digestão anaeróbia, apresenta um valor médio de concentração de HHCB de 6788,4 ng/g. Como se pode verificar este é mais baixo do que o detetado por Ternes *et al.* (2005) (que também realiza digestão anaeróbia), mas semelhante ao do estudo realizado por Lv *et al.* (2010). Comparando os quatro estudos, verifica-se que os valores médios de concentração de HHCB não diferem significativamente, o que leva a concluir que a etapa de desidratação não afetará significativamente os resultados.

Na Tabela 5 são ainda apresentados outros estudos, como por exemplo o de Wu e Ding (2010) e Llompart *et al.* (2003), cujo funcionamento da ETAR não é descrito em pormenor. Além deste fato, não é analisado um grande número de amostras, não sendo uma amostragem representativa. Ambos os estudos tiveram como objetivo o desenvolvimento de um método de extração, no caso de Wu e Ding (2010) a extração assistida por microondas acoplada à microextração em fase sólida (MA-HS-SPME) e no estudo de Llompart *et al.* (2003), o SPME.

Numa análise geral à Tabela 5 é possível constatar que o HHCB esteve sempre presente em todas as amostras de lama provenientes de processos distintos de ETARs de todo o mundo, sendo o *musk* que apresentou quase sempre as concentrações mais elevadas em relação aos outros.

Tabela 5- Estudos realizados para a determinação de *galaxolide* em lamas de ETAR.

Local	Tipo de Lama	Preparação da amostra	Extração e <i>clean-up</i>	Método analítico	Limite de deteção (ng/g)	% Rec	Concentração média (ng/g, peso seco)	Referência
Suíça	(A) Bruta de esgoto doméstico (B) Bruta de esgoto doméstico + escoamento de águas pluviais + baixas quantidades de esgoto industrial (C) Bruta de esgoto doméstico + escoamento de águas pluviais + altas quantidades de esgoto industrial	---	LLE: hexano (2 h) GPC: bio-beads SX3; ciclohexano e acetato de etilo SPE: cartucho de sílica, diclorometano	HRGC-MS/MS	0,10 ng/mL	---	(A): 5991,2 (B): 3361,7 (C): 3103,0	Herren e Berset (2000)
Espanha	(A) Tratamento primário (B) Tratamento secundário	---	SPME: fibra de PDMS-DVB, tempo de adsorção: 90 min; temperatura de adsorção: 100 °C	GC-MS	A: 0,088 B: 0,032	---	(A): 129 (B): 162	Llompарт <i>et al.</i> (2003)
Suíça	(A) Processo de arejamento (B) Tratamento secundário por lamas ativadas	---	LLE: hexano (350-400 rpm, 2h a temperatura ambiente)	HRGC-EI-SIM-MS	23	79	(A): 20900 (B): 20500	Kupper <i>et al.</i> (2004)
Suíça	Tratamento secundário por lamas ativadas	---	LLE: hexano (2 h)	GC-MS	23	78	4300	Berser <i>et al.</i> (2004)
Suíça e Alemanha	(A) Tratamento secundário (digestão anaeróbia) (B) Tratamento secundário (lamas ativadas)	Filtradas por filtro de fibra de vidro Liofilizadas	PLE (metanol) USE (metanol, acetona, 5 min) Colunas de C18 e sílica	LC-MS GC-MS	---	87	(A): 15000 (B): 6000	Ternes <i>et al.</i> (2005)

Tabela 5- Estudos realizados para a determinação de galaxolide e lamas de ETAR (cont.).

Local	Tipo de Lama	Preparação da amostra	Extração e <i>clean-up</i>	Método analítico	Limite de detecção (ng/g)	% Rec	Concentração média (ng/g, peso seco)	Referência
China	(A) Bruta de esgoto doméstico e industrial	Liofilizadas Peneiradas (30-mesh)	Soxhlet : diclorometano Colunas de gel de sílica e alumina	GC-MS	100 ng/mL	109	(A): 10762	Zeng <i>et al.</i> (2005)
	(B) Bruta de esgoto industrial (produção de produtos de limpeza e higiene pessoal)						(B): 367900	
	(C) Bruta de esgoto proveniente de indústria alimentar						(C): 82	
Canadá	(A) Bruta de esgoto	---	ASE (hexano e acetato de etilo)	GC-MS	---	>80	(A): 3302,5	Yang e Metcalfe (2006)
	(B) Tratamento secundário (lamas ativadas)		GPC (biobeads S-X)				(B): 3309,9	
	(C) Tratamento de lamas (digestão de biosólidos)						(C): 6788,4	
Canadá	(A) Tratamento primário	Secas ao ar (3 dias) e moídas	SFE (CO ₂ supercrítico, eluente: acetona)	GC-MS	41	SFE: 88 MAE: 86	(A) secas ao ar: 21550; centrif./filt. :	Smyth <i>et al.</i> (2007)
	(B) Tratamento secundário (lamas ativadas)	Centrifugadas (4000 rpm 20 mins a 4°C)	Coluna de gel de sílica (eluente: hexano com 5% de acetona)				28300	
		Filtradas	MAE (acetona e hexano)				(B) secas ao ar: 22150; centrif./filt. :59500	

Tabela 5- Estudos realizados para a determinação de galaxolide e lamas de ETAR (cont.).

Local	Tipo de Lama	Preparação da amostra	Extração e <i>clean-up</i>	Método analítico	Limite de deteção (ng/g)	% Rec	Concentração média (ng/g, peso seco)		Referência
China	(A) Tratamento primário (B) Tratamento secundário (lamas ativadas)	---	Soxhlet (diclorometano)	GC-MS	120ng/mL	107	(A): 512450 (B): 565670		Chen <i>et al.</i> (2007)
USA	(A) Tratamento secundário (lamas ativadas) (B) Tratamento de lamas (desidratadas, primárias + secundárias) (C) Tratamento de lamas (final, primárias + secundárias) (D) Tratamento de lamas (incineradas, primárias + secundárias)	---	Soxhlet (hexano/ diclorometano)	GC-MSD	---	84	Kentucky Georgia (A) 12800 39000 (B) 7500 14000 (C) 9500 - (D) - <20		Horri <i>et al.</i> (2007)
Hong Kong	(A) Tratamento primário (desidratada) (B) Tratamento secundário (desidratadas, lamas ativadas) (C) Tratamento terciário (desidratadas)	---	Soxhlet: diclorometano e hexano Colunas de gel de sílica e alumina	GC-MSD	0,09 ng/mL	101	(A): 8000 (B): 22000 (C): 45000		Shek <i>et al.</i> (2008)
China	(A) Tratamento terciário (remoção de fósforo e azoto) (B) Tratamento secundário (reator anóxico/óxico) (C) Tratamento secundário (processo de arejamento)	Filtradas por filtro de fibra de vidro Liofilizadas	Lama filtrada: SPE (Oasis HLB; acetato de etilo) + Colunas de gel de sílica Lama liofilizada: USE (hexano/acetona, 10 mins)	GC-MS	200	74,8	(A): 4700 (B): 7800 (C): 14900		Zhou <i>et al.</i> (2009)

Tabela 5- Estudos realizados para a determinação de galaxolide e lamas de ETAR (cont.).

Local	Tipo de Lama	Preparação da amostra	Extração e <i>clean-up</i>	Método analítico	Limite de detecção (ng/g)	% Rec	Concentração média (ng/g, peso seco)	Referência
Coreia do Sul	(A) Primárias + secundárias de esgoto doméstico (desidratadas)	Liofilizadas, moídas e peneiradas (600 µm)	ASE: acetona e hexano Colunas de gel de sílica	GC-MS	7	85	(A): 47900	Guo <i>et al.</i> (2010)
	(B) Primárias + secundárias de esgoto de indústria farmacêutica (desidratadas)						(B): 9090	
	(C) Primárias + secundárias de esgoto de uma pecuária (desidratadas)						(C): 2398	
China	(A) Tratamento preliminar (separação de areias/gorduras)	Centrifugadas (10000 rpm, 5 min)	LLE: hexano (2 h)	GC-MS	0,002 ng/mL	72,2-107,8	(A): 1846,8	Lv <i>et al.</i> (2010)
	(B) Tratamento primário						(B): 3005,4	
	(C) Tratamento secundário						(C): 3380,1	
	(D) Tratamento de lamas (desidratadas, primárias + secundárias)						(D): 3409,2	
Taiwan	(A) Tratamento primário (clarificação)	Filtradas	MA-HS-SPME (80 W, 5 min, fibra PDMS-DVB)	GC-MS	0,04	83 - 87	(A): 1,4	Wu e Ding (2010)
	(B) Tratamento de floculação (lamas desidratadas)						(B): 2,8	

3 Descrição Técnica

3.1 Reagentes

No presente trabalho foi utilizada uma solução comercial de *galaxolide* (50% em dietilftalato) adquirida à empresa Sigma-Aldrich (St Louis, E.U.A). Na preparação da solução “mãe” foi utilizado etanol (grau pro-análise) obtido à Riedel-de Haën (Hannover, Alemanha), enquanto na preparação da solução *stock* foi usado ACN (grau isocrático para HPLC) obtido à VWR International (Pennsylvania, E.U.A). Para a preparação da fase móvel utilizou-se ACN da mesma marca e ácido acético (100% grau pró-análise) da Pronalab (Tlalnepantla, México). Na extração foram utilizados os seguintes QuEChERS: ECMSSA50CT (6000 mg de MgSO_4 e 1500 mg de CH_3COONa) e ECMPSC1815C (900 mg de MgSO_4 , 300 mg de PSA e 100 mg de C_{18}), ambos obtidos à UCT (Estados Unidos).

3.2 Preparação de Padrões

Para a preparação da solução “mãe” foi pesado aproximadamente 10,5 mg da solução comercial de *galaxolide* para um balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume com etanol. A concentração da solução resultante foi de 52,5 mg/L (*ver cálculos no Anexo 1*). A partir desta solução preparou-se um padrão intermédio de concentração 200 $\mu\text{g/L}$ em ACN. A partir deste prepararam-se os 7 restantes padrões em ACN para a construção da reta de calibração (8 padrões com concentrações entre 1 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$).

Para os ensaios de recuperação foi preparado um outro padrão, pesando 10mg da solução comercial para um balão de 10 mL e fez-se o volume com ACN. A concentração deste padrão foi de 455 mg/L (*ver cálculos no Anexo 1*).

3.3 Amostragem

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com a ETAR de Parada, que gentilmente cedeu as amostras de lama desidratada. A ETAR de Parada situa-se em Águas Santas (Maia) e trata efluentes provenientes maioritariamente da Maia (75%) e parte da freguesia de S. Mamede Infesta, Matosinhos (25%). Abrange assim cerca de 80 000 habitantes e trata um volume médio diário de 18 000 m^3 , sendo 70% doméstico e os restantes 30% de origem

industrial. É importante referir que, para além da linha de tratamento de águas, esta estação possui uma linha de tratamento de lamas, onde é efetuada a sua valorização através da produção de um fertilizante orgânico.

Resumidamente, as águas residuais que chegam à ETAR de Parada são enviadas para uma estação elevatória (aumento de cota) de modo a que o transporte se dê por ação da gravidade. Estas são então enviadas para um sistema de gradagem para remoção de sólidos grosseiros e de seguida para desarenadores (tratamento preliminar). As areias e grados separados são posteriormente enviados para aterro. Após este tratamento preliminar, as águas residuais são conduzidas para decantadores primários. Nestes decantadores as águas permanecem cerca de 3 horas e os sólidos sedimentáveis (lamas primárias) são separados dos efluentes. Neste sistema de tratamento cerca de 30% da matéria poluente é eliminada. De seguida, as águas residuais sofrem um tratamento biológico (tratamento secundário). Estas são misturadas com biomassa em suspensão em tanques de arejamento, sendo submetidas a digestão aeróbica. O tempo de passagem nesta unidade é, em média, de 6 horas. Para garantir que os microrganismos e o substrato existam em equilíbrio é feita a recirculação de lamas. Nesta fase final as águas são enviadas para decantadores para que haja a remoção dos flocos biológicos (lamas secundárias ou lamas ativadas). Após este tratamento o efluente final é lançado ao Rio Leça.

Para além do tratamento das águas residuais propriamente ditas, a ETAR de Parada procede igualmente à reciclagem das lamas produzidas no processo de tratamento. Assim, as lamas acumuladas nos decantadores são conduzidas para espessadores com o intuito de retirar água e assim, diminuir o seu volume. Estas lamas são então enviadas para digestores anaeróbios aquecidos a 30 °C, onde permanecem durante cerca de 20 dias. Estas unidades têm como objetivo degradar a biomassa através de microrganismos metanogénicos, na ausência de oxigénio. Após este processo as lamas são enviadas para digestores secundários de modo a que ocorra a estabilização e ao mesmo tempo haja um aumento do teor em sólidos. Com a finalidade de diminuir a humidade nas lamas, estas são enviadas para um sistema de desidratação mecânica através de centrífugas (lama desidratada). De seguida esta lama sofre o processo de compostagem. A lama é misturada com casca de pinheiro e colocada em silos durante cerca de 20 dias, a temperatura controlada. Após esse período é colocada a estabilizar, sendo posteriormente embalada para venda como corretivo orgânico para solos - Agronat.

Para este trabalho, amostras de lama desidratada foram recolhidas da centrífuga da ETAR de Parada durante 8 dias úteis (entre 20 Novembro e 29 Novembro de 2013). Após chegar ao laboratório, a lama foi imediatamente extraída - extração a húmido. Para a

determinação do teor de humidade foi também colocada uma porção dessa lama no excicator até peso constante. Outra porção foi colocada numa placa de vidro e foi exposta ao ar ambiente durante os dias que levaram a esse peso constante. Nessa altura a amostra foi moída num moinho elétrico caseiro (Briel - Modelo CG, Maia, Portugal) e homogeneizada num almofariz para ser extraída a seco.

3.4 Extração e *cleanup*

O método de extração/*cleanup* utilizado foi adaptado de um estudo anteriormente desenvolvido para produtos de higiene pessoal (Correia *et al.*, 2013). Para se proceder à extração foram pesados 2 g de lama para um tubo de Falcon com capacidade de 50 mL e foram adicionados 15 mL de ACN como solvente de extração. Caso fosse realizado um teste de recuperação, o padrão era adicionado imediatamente após a pesagem e só depois adicionado o ACN. A mistura foi agitada durante 3 minutos no vórtex (IKA, Stanfen, Alemanha) e posteriormente colocada no ultrassons (Selecta, Barcelona, Espanha) durante 10 minutos. De seguida foi adicionado o QuEChER ECMSSA50CT (6000 mg de MgSO_4 e 1500 mg de CH_3COONa), contendo os sais necessários à secagem e partição da amostra, e o tubo de Falcon foi novamente agitado durante 3 minutos no vórtex. A amostra foi então centrifugada (Hettich Zentrifugen Rotofix, Tuttlingen, Alemanha) a 3700 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação a fração líquida foi transferida para outro tubo de Falcon, onde previamente foi adicionado o QuEChER ECMPSC1815C (900 mg de MgSO_4 , 300 mg de PSA e 100 mg de C_{18}), cuja função foi remover alguns interferentes (como por exemplo as gorduras) pelo método SPE-dispersivo. Para promover a dispersão, a amostra foi agitada durante 3 minutos no vórtex e posteriormente foi centrifugada a 3700 rpm durante 10 minutos. A fração líquida foi recolhida para um tubo PP (50 mL), que foi armazenado no congelador ($-18\text{ }^\circ\text{C}$) ao abrigo da luz para posteriormente se proceder à análise por HPLC-FL. Na Figura 11 é apresentado um fluxograma que resume o método de extração adotado.



1- Pesagem de 2g de amostra



2- Adição de 15 mL de ACN



3- Agitação por vórtex (3 min)



4- Extração por ultrassons (10 min)



5- Adição do QuEChER (6000 mg MgSO_4 e 1500 mg CH_3COONa)



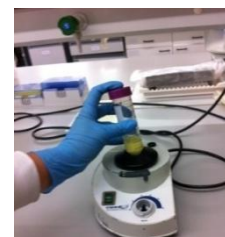
6- Agitação por vórtex (3 min)



7- Centrifugação (3700 rpm, 10 min)



8- Adição do sobrenadante ao QuEChER (900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA e 100 mg C_{18})



9- Agitação por vórtex (3 min)



10- Centrifugação (3700 rpm, 10 min)

Figura 11- Sequência do método de extração QuEChERs.

3.5 Instrumentação

Para este trabalho utilizou-se um sistema de cromatografia líquida (Figura 12) equipado com uma bomba Merck-Hitachi L6200A, injetor manual Reodyne 7725i *loop*, um detetor de fluorescência Merck-Hitachi F-1080 e uma interface D-7000 (Tóquio, Japão). Os dados foram adquiridos e processados pelo *software* Merck-Hitachi Mode D-7000 Chromatography Data Station.

Para a análise do *galaxolide* foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ de fase reversa LiChrospher® (250 mm x 4 mm, 5 µm) da marca Merck (Whitehouse Station, NJ, E.U.A), em combinação com uma pré-coluna do mesmo modelo e marca (4 mm x 4 mm). A fase móvel foi utilizada em modo isocrático e era composta por ACN e água destilada (80:20, v:v), acidificados com ácido acético (12 mM). O caudal foi de 1 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 120 µL. O detetor de fluorescência foi regulado para um comprimento de onda de excitação de 280 nm e para um comprimento de onda de emissão de 310 nm. O tempo total das corridas foi de 15 minutos e o tempo de retenção do *galaxolide* foi cerca de 12 minutos.

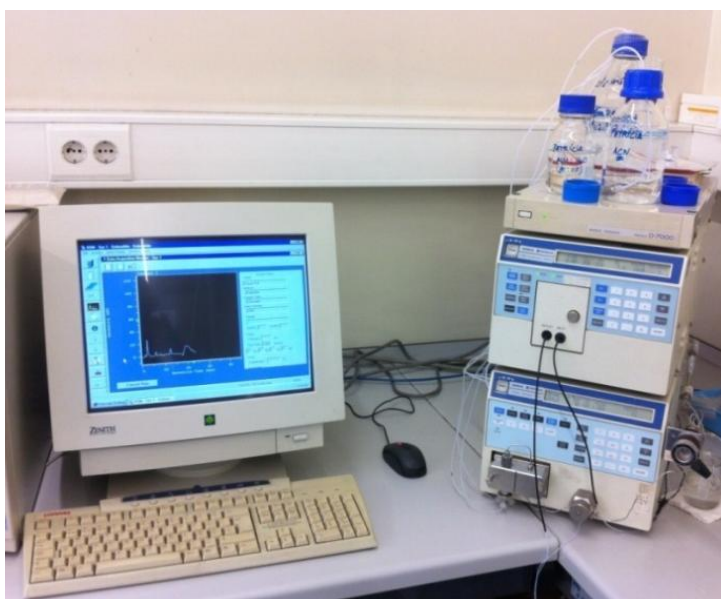


Figura 12-HPLC com detetor de fluorescência e sistema de aquisição de dados.

3.6 Controlo de qualidade

O *galaxolide* é um composto que é utilizado na maior parte dos produtos de higiene pessoal e produtos de limpeza. Para evitar qualquer contaminação das amostras de lama tornou-se importante ter um cuidado acrescido em relação à não utilização de perfumes,

cremes, detergentes ou outros produtos com fragrâncias por parte dos operadores. Ainda assim foram realizados alguns brancos laboratoriais para se poder perceber como as análises poderiam ser afetadas por possíveis contaminações. Conforme será visto no ponto 4, os brancos apresentam valores que não estão abaixo do limite de deteção, logo tornou-se importante fazer um ajustamento às concentrações de HHCB detetadas, descontando-se o valor do branco laboratorial.

3.7 Acondicionamento de Resíduos

Os resíduos gerados durante o trabalho consistiram nomeadamente em soluções orgânicas contendo ACN e vestígios de *galaxolide* e misturas de MgSO_4 , CH_3COONa , PSA, C_{18} e alguns resíduos provenientes das lamas da ETAR. Os solventes foram armazenados em recipientes devidamente rotulados para compostos orgânicos e os resíduos dos QuEChERS e as lamas foram armazenados noutro recipiente específico para resíduos sólidos. Ambos permaneceram fechados, protegidos da luz e longe de fontes de ignição e posteriormente foram encaminhados para o tratamento de resíduos do EcoFEUP (Sistema de Gestão Ambiental da FEUP).

4 Resultados e Discussão

4.1 Validação do método analítico para deteção de *galaxolide* em lamas de ETAR

Neste estudo foi utilizada uma metodologia de QuEChERS associada à deteção por HPLC-FL para a determinação do *galaxolide* em lamas de ETAR. Para validar o método analítico alguns parâmetros como a gama de linearidade da reta de calibração, os limites de deteção e quantificação, a precisão, a exatidão e a incerteza global (modelo *bottom-up*) foram determinados. Para iniciar o processo de validação do método analítico procedeu-se à injeção de padrões de *galaxolide* e à construção de uma reta de calibração.

4.1.1 Reta de calibração

A reta de calibração foi construída a partir da injeção direta de 8 soluções padrão de *galaxolide*, preparadas em ACN, com concentrações entre 1 µg/L e 200 µg/L (5 ng/g e 1000 ng/g) (Figura 13) (ver tabela em Anexo 2).

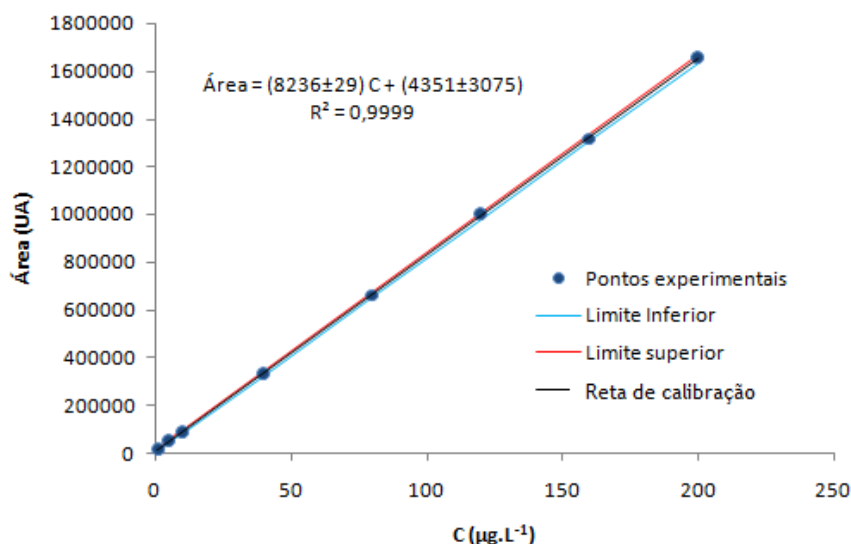


Figura 13-Reta de calibração para o *galaxolide* e os seus limites de confiança (95%).

Através da análise dos cromatogramas das soluções padrão (Figura 14) verificou-se que o tempo de retenção do *galaxolide* foi cerca de 12 minutos. As pequenas variações ocorridas

nos tempos de retenção ao longo das diversas corridas cromatográficas estão relacionadas com a variação da temperatura (análises efetuadas à temperatura ambiente). A temperatura pode influenciar a capacidade de adsorção dos compostos por parte da coluna, sendo que a baixas temperaturas a fase estacionária da coluna tende a reter mais os analitos e, por isso, os tempos de retenção são mais longos. Na Figura 14 apresenta-se um cromatograma da solução padrão de 200 µg/L que foi injetada todos os dias, funcionando como padrão de controlo.

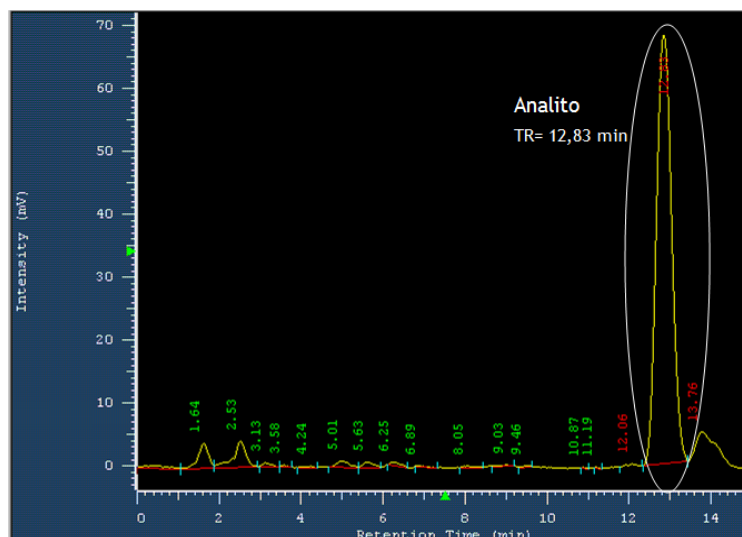


Figura 14-Cromatograma resultante da injeção da solução padrão de *galaxolide* de 200 µg/L.

Analisando os critérios que asseguram se uma reta de calibração é adequada para ser utilizada em análise, verifica-se que o coeficiente de correlação é superior a 0,9950 ($R^2=0,9999$). É também importante que o desvio padrão relativo do declive tome um valor inferior a 5%, o que também é assegurado ($S_a/a=0,4\%$). Porém existe um critério que não se verifica, a ordenada na origem não contém a própria origem, uma vez que $b-s_b=1277$ e $s+s_b=7426$ (ver Anexo 2). Ainda assim, este critério não interferiu negativamente na análise de lamas de ETAR. Tendo em conta o fim a que se destina esta metodologia (determinação de *galaxolide* em lamas de ETAR - concentrações detetadas elevadas), pode-se afirmar que a reta de calibração obtida era adequada para ser utilizada em análise.

4.1.2 Limites de deteção e quantificação

O limite de deteção (LOD) permite determinar a concentração mínima a partir da qual é possível deduzir a presença do analito e o limite de quantificação (LOQ) corresponde à mais pequena concentração do analito que é possível medir, com o grau de exatidão e de precisão

definidos no método. Neste trabalho determinaram-se estes limites com base na razão sinal/ruído. No caso do limite de deteção é exigido que o sinal seja 3 vezes superior ao ruído e para o limite de quantificação 10 vezes superior. Os limites de deteção e quantificação do método analítico foram de 0,29 µg/L e 0,97 µg/L, respetivamente (o que corresponde a 1 ng/g e 5 ng/g). O limite de deteção do método de extração obtido neste trabalho foi inferior ao obtido por Smyth *et al.* (2007) (SFE: LOD = 41 ng/g), Zhou *et al.* (2009) (SPE: LOD = 200 ng/g), Berset *et al.* (2004) e Kupper *et al.* (2004) (LLE: LOD = 23 ng/g). No estudo elaborado por Wu e Ding (2010), que utilizaram lama desidratada, o limite de deteção foi inferior ao apresentado neste estudo, cerca de 0,04 ng/g, utilizando uma metodologia de MA-HS-SPME.

4.1.3 Avaliação da Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre os resultados de uma amostra. Essa proximidade é medida pelo desvio padrão relativo (%CV) (ver Anexo 2). Para a avaliação da precisão foi determinada a precisão intermédia e a repetibilidade para alguns padrões. Para a determinação da precisão intermédia foram injetados 3 padrões de níveis diferentes, 1 µg/L, 80 µg/L e 200 µg/L, 2 vezes cada um, em 3 dias diferentes. No caso da repetibilidade foram injetados os mesmos padrões, no mesmo dia, 4 vezes. A Tabela 9 expressa os resultados da precisão intermédia e da repetibilidade em %CV.

Tabela 6- Desvio padrão relativo determinado para a precisão intermédia e repetibilidade.

Padrão (µg/L)	Precisão intermédia (%)	Repetibilidade (%)
1	39,25	5,46
80	3,65	3,56
200	0,73	0,24

Pela análise da tabela verifica-se que para a repetibilidade e precisão intermédia os valores de %CV são bastante próximos e inferiores a 10% (valor tomado usualmente como referência), com exceção do obtido para o nível de concentração mais baixo da precisão intermédia. Tal como seria expectável, pode-se também verificar que para as concentrações mais elevadas o método é mais preciso do que para concentrações baixas. Ainda nesta análise de precisão deveriam ter sido efetuados ensaios com amostras de lama, contudo o tempo de realização deste estudo não o permitiu.

4.1.4 Avaliação da Exatidão

A exatidão é definida como o parâmetro que avalia a concordância entre o valor obtido pela análise e o valor que é esperado obter. Neste trabalho, este parâmetro foi avaliado através da realização de ensaios de recuperação pelo método da adição de padrão. Os ensaios foram realizados a 3 níveis diferentes de concentração adicionados à lama depois de seca e à lama húmida (ver Anexo 2). A Tabela 7 apresenta os níveis a que essa avaliação foi feita e as respetivas percentagens de recuperação.

Tabela 7- Recuperações a 3 níveis para a lama seca e húmida.

	Lama seca	Lama húmida
C (µg/L)	% Rec ± desvio-padrão	% Rec ± desvio-padrão
10	66 ± 4	92 ± 10
50	75 ± 4	77 ± 7
100	65 ± 4	64 ± 1
Média	69 ± 6	78 ± 14

Pela análise da Tabela 7 verifica-se que os valores de recuperação obtidos na lama húmida são bastante similares aos obtidos para a lama seca. Assim concluiu-se que o fato de a lama ficar a secar na *hotte*, à temperatura ambiente, durante cerca de 13 dias, estando exposta ao ar e em ventilação forçada, não altera significativamente os resultados. Contudo a influência do processo de secagem não pode ser discutida, uma vez que deveriam ter sido realizados estudos de recuperação em que a adição de padrão fosse feita previamente ao processo de secagem.

A percentagem de recuperação média das lamas secas foi cerca de 69%, o que pode levar a concluir que existam métodos de extração mais eficientes que o método QuEChERS para a extração de lamas secas. Conforme foi visto na literatura, estudos como o de Horii *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008) e Lv *et al.* (2010) também analisam lamas desidratadas e as percentagens de recuperação foram superiores às apresentadas neste estudo. No caso de Horii *et al.* (2007) e de Shek *et al.* (2008) as percentagens de recuperação são superiores a 80% e ambos os estudos realizam a extração pelo método Soxhlet. No estudo de Lv *et al.* (2010) a recuperação foi cerca de 90% utilizando o LLE. No caso da lama húmida, a recuperação tomou o valor médio de 78%. Até ao momento não são conhecidos estudos que executem a extração da lama a húmido e por isso não é possível comparar este estudo com os encontrados na literatura.

4.1.5 Incerteza Global

A incerteza é o parâmetro que mede o desempenho analítico de um método face aos resultados obtidos. Na avaliação da incerteza global consideram-se diversos fatores como por exemplo a amostragem, as condições experimentais e os efeitos de matriz e interferências e, por isso, para avaliar este parâmetro é necessário considerar as várias fontes (Guia EURACHEM/CITAC). Neste trabalho a incerteza global é avaliada pelo método *bottom-up*, em que cada fonte de incerteza é analisada individualmente, ou seja, todas as etapas da medição são avaliadas (Caten e Jornada, 2007). Neste método são consideradas a incerteza relacionada com a preparação dos padrões analíticos (U_1), com a reta de calibração (U_2), com a precisão (U_3) e com a exatidão (U_4) (Homem, 2011; Ratola *et al.*, 2004). A Tabela 8 apresenta os valores das incertezas associadas a cada fonte e a incerteza global para o método de extração da lama seca.

Tabela 8- Incertezas associadas a cada fonte e incerteza global para o método de extração com lama seca.

C (µg/L)	Preparação de padrões	Curva de calibração	Precisão	Exatidão	% U_{global}
	% U_1	% U_2	% U_3	% U_4	
1	16,2	62,8	22,7	4,1	69
5	16,2	12,4	22,7	4,1	31
10	16,2	6,2	2,1	3,6	18
40	16,2	1,5	2,1	3,6	17
80	16,2	0,7	2,1	3,6	17
120	16,2	0,5	0,4	4,1	17
160	16,2	0,4	0,4	4,1	17
200	16,1	0,4	0,4	4,1	17

Embora tenham sido consideradas duas matrizes, a lama seca e a lama húmida, os valores apresentados na Figura 15 e Figura 16 são referentes apenas à lama seca, uma vez que a incerteza global para a lama seca e húmida foi semelhante. Todos estes cálculos encontram-se descritos no Anexo 2.

Na Figura 15 pode-se verificar o peso de cada uma das fontes de incerteza para a determinação da incerteza global.

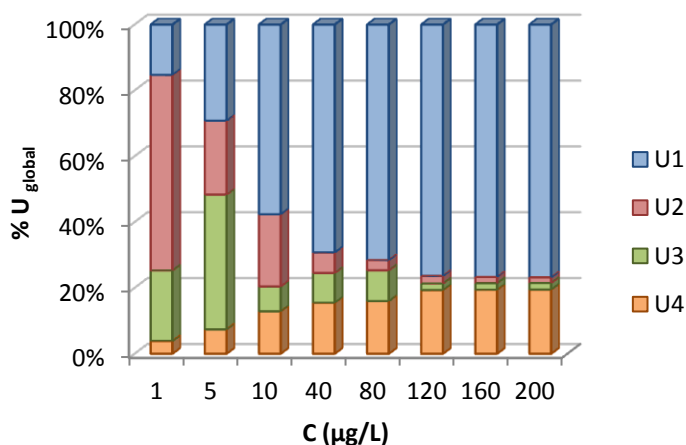


Figura 15- Peso de cada uma das fontes de incerteza no cálculo da incerteza global.

Pela análise da Figura 15 é possível verificar que a fonte que contribuiu mais para a incerteza global foi a incerteza associada à preparação dos padrões, principalmente na preparação dos padrões mais altos. A razão dever-se-á provavelmente ao fato dos padrões mais altos terem sido preparados com pipetas de vidro que geram erros maiores que aqueles padrões que foram preparados com micropipeta. Outro aspecto que se ressalta é o fato das concentrações mais baixas serem mais afetadas pela incerteza associada à reta de calibração. O mesmo acontece com a incerteza associada à precisão, pois o valor do desvio padrão relativo (%CV) vai ser maior para concentrações mais baixas, ou seja, é mais difícil obter picos reprodutíveis em concentrações mais baixas (por não serem tão definidos). A incerteza associada à exatidão toma percentagens mais significativas nas concentrações mais altas. A Figura 16 representa a incerteza global em função da concentração.

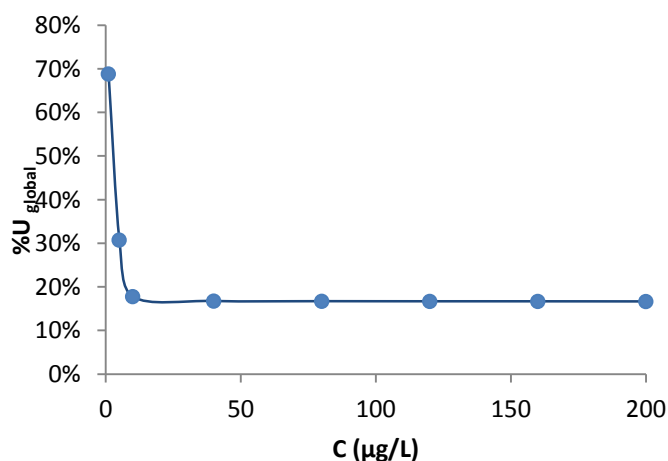


Figura 16-Incerteza global em função da concentração.

Numa análise ao gráfico da Figura 16 constata-se que a incerteza global é constante, cerca de 17%, entre os 40 e 200 µg/L. Tal como seria de esperar, para valores inferiores a 40 µg/L a incerteza aumenta exponencialmente, atingindo os 69% para o padrão de concentração mais baixa (1 µg/L).

4.2 Deteção de *galaxolide* nas lamas da ETAR de Parada

Neste trabalho foram analisadas 8 amostras de lama proveniente da centrífuga da ETAR de Parada, com o intuito de detetar e posteriormente quantificar a presença de *galaxolide* nas mesmas. Ao chegar ao laboratório, parte da lama foi extraída a húmido e outra parte foi mantida numa *hotte* à temperatura ambiente durante 13 dias. Os extratos foram então analisados por HPLC-FL e detetou-se *galaxolide* em todas as amostras. Como já foi referido anteriormente, foi injetado um padrão de controlo (200 µg/L) por cada *batch* de amostras. Todas as amostras de lama foram diluídas e injetadas, pelo menos duas vezes, até se obter valores, para as áreas, reproduzíveis. No caso de dúvida, na identificação do composto, foi adicionado padrão de concentração 200 µg/L ao extrato para confirmar a presença do *galaxolide* (o pico referente a este composto iria aumentar).

Na Tabela 9 e na Figura 17 apresentam-se as quantidades de *galaxolide* detetadas em todas as amostras extraídas a seco e a húmido, com os valores convertidos em base seca, com o valor médio do branco descontado e feita a correção pelos valores de recuperação. Os valores das áreas e respetivos cálculos de conversão para concentração em ng/g são apresentados no Anexo 3.

Tabela 9- Concentrações de *galaxolide* corrigidos pelo valor de recuperação.

Amostra	Seca (ng/g)	Húmida (ng/g)	Média branco (ng/g)	Conversão seca (ng/g)	Conversão húmida (ng/g)
A1	2820	-	40	4053	-
A2	4103	18985		5923	24476
A3	3948	18404		5697	23726
A4	3407	20931		4908	26991
A5	3275	21458		4716	27672
A6	2892	18778		4158	24210
A7	4000	18309		5772	23604
A8	4703	17679		6798	22789

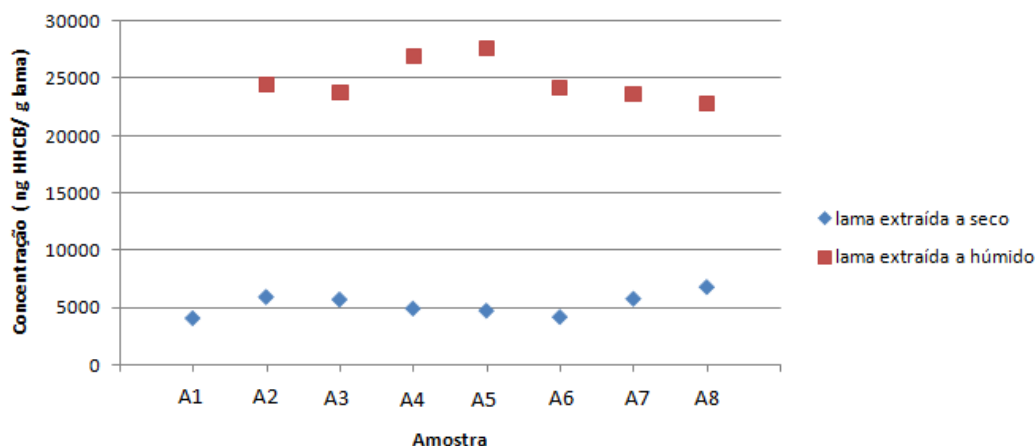


Figura 17-Gráfico das concentrações de HHCB corrigidos pelo valor de recuperação.

Pela análise da Tabela 9 e do gráfico da Figura 17 constata-se que as lamas extraídas a seco têm uma concentração de *galaxolide* inferior às lamas extraídas a húmido. Provavelmente o fator que influenciou esta diferença de concentrações foi o processo de secagem das lamas, que estiveram 13 dias numa *hotte* com ventilação forçada à temperatura ambiente, favorecendo a volatilização do *galaxolide*. Na Figura 18a) e 18b) apresentam-se dois cromatogramas de uma mesma lama extraída a seco e extraída a húmido, respetivamente.

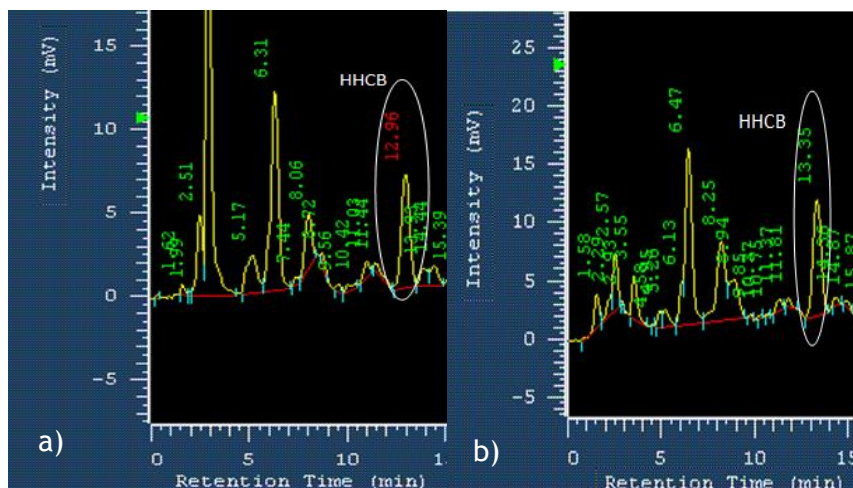


Figura 18- Cromatograma da a) lama seca extraída, b) lama húmida extraída.

Em relação à lama extraída a seco é possível verificar que o *galaxolide* apresenta um tempo de retenção de cerca de 12,96 minutos. A Figura 18b) é referente à lama extraída a húmido, com o pico do *galaxolide* a apresentar-se aos 13,35 minutos. Tanto o cromatograma

da lama extraída a seco como o da extraída a húmida apresentam, além do *galaxolide*, compostos interferentes. Ainda assim é perceptível a definição do pico do *galaxolide* facilitando a sua identificação.

Analisando os resultados obtidos da extração das 8 amostras, verifica-se que a concentração média de *galaxolide* nas lamas extraídas a seco foi cerca de 5253 ng/g e a da lama extraída a húmido cerca de 24781 ng/g. Comparando as concentrações de *galaxolide* das lamas extraídas a seco obtidas neste estudo com os estudos apresentados na literatura, que analisam lamas desidratadas, constata-se que os valores de concentração não diferem muito. Horri *et al.* (2007) realizam a extração por Soxhlet, obtendo uma concentração média entre 7500 e 14000 ng/g para as lamas tratadas desidratadas (primárias + secundárias). Tal como Horri *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008) também realizam a extração por Soxhlet obtendo uma concentração média de 8000 ng/g para as lamas primárias e de 22000 ng/g para as lamas ativadas. Já Lv *et al.* (2010) realizam a extração por LLE e a concentração média foi cerca de 3409 ng/g. Assim como neste estudo, Horri *et al.* (2007), Sheket *al.* (2008) e Lv *et al.* (2010) realizaram processos de secagem previamente à extração, adição de sulfato de sódio anidro, liofilização e centrifugação, respetivamente. Ainda que os processos de secagem e extração sejam diferentes dos realizados neste estudo, as concentrações médias de *galaxolide* são muito semelhantes. Pequenas diferenças entre os valores devem-se provavelmente ao comportamento da população, características do afluente e do número de pessoas que a ETAR serve. Outro estudo que apresenta um tipo de lama semelhante ao estudo presente, mistura de lamas primárias e secundárias desidratadas, é o de Guo *et al.* (2010). Guo *et al.* (2010) extraíram a lama após um processo de secagem por liofilização e obtiveram uma concentração média de *galaxolide* de 47900 ng/g para a lama proveniente de um esgoto doméstico. Em comparação com o valor médio detetado no estudo presente para as lamas extraídas a seco (5253 ng/g) verifica-se que a ordem de grandeza difere um pouco mas tal pode estar relacionado com as razões já mencionadas anteriormente, como os hábitos da população consoante a localização do estudo. Ainda assim o processo de secagem também pode ter influência, talvez a perda de *galaxolide* pela exposição da lama ao ar ambiente seja maior do que quando esta é liofilizada. Relativamente às lamas extraídas a húmido não é possível estabelecer uma comparação com os estudos encontrados na literatura uma vez que grande parte deles apenas realiza a extração a seco. Os estudos que não fazem referência a processos de secagem são os de Llompарт *et al.* (2003), Kupper *et al.* (2004), Berset *et al.* (2004), Yang e Metcalfe (2006) e Chen *et al.* (2007), no entanto as lamas analisadas nestes estudos não provêm do processo de desidratação. Ainda assim o estudo de Berset *et al.* (2004) e Yang e Metcalfe (2006) apresentam concentrações médias de *galaxolide* de ordem de grandeza muito semelhante à deste estudo, cerca de 4300 ng/g e 3309 ng/g, respetivamente.

Para além destes resultados, poderia ser feita uma crítica acerca das quantidades de *galaxolide* detetadas nas lamas de dias diferentes. Contudo, o tempo de residência destas lamas no tanque de arejamento é cerca de 20 dias. As amostras de lama, tendo sido todas recolhidas dentro deste período de dias, não apresentam diferenças significativas. Uma vez mais, o tempo de realização deste trabalho não permitiu que fosse feita uma amostragem mais longa, com amostras que não fossem abrangidas pelo mesmo período de tempo de residência das lamas, no tanque de arejamento.

Numa análise geral aos resultados obtidos, conclui-se que as lamas de ETAR apresentam concentrações de *galaxolide* bastante elevadas. Uma vez que estas mesmas lamas são utilizadas como fertilizantes agrícolas, torna-se importante desenvolver tratamentos que possam ser mais eficazes na remoção de *galaxolide* (nas ETARs) para evitar que o ciclo de contaminação, por parte deste composto, se complete.

Conclusões

Neste trabalho o método de extração QuEChERS foi adaptado para a extração de *galaxolide* em lamas de ETAR, em matriz seca e húmida onde foi utilizada a metodologia analítica HPLC-FL.

A validação do método analítico passou pela avaliação de vários parâmetros como a linearidade do método, os limites de deteção e quantificação, a precisão, a exatidão e a incerteza global. A gama de linearidade do método apresentou-se entre os 5 e os 1000 ng/g e os critérios que asseguram a adequação da reta foram verificados. Os limites de deteção do método analítico foram inferiores à grande parte dos estudos apresentados na literatura. A precisão foi avaliada segundo a precisão intermédia e repetibilidade a três níveis, 1, 80 e 200 µg/L, com percentagens de desvio padrão relativo inferiores a 10%, exceto para o valor de precisão intermédia do nível mais baixo. A incerteza global foi constante entre os padrões de 10 µg/L e 200 µg/L sendo que para os dois padrões mais baixos, de 1 e 5 µg/L, a incerteza global tomou valores mais baixos. A fonte que mais contribuiu para a incerteza global foi a incerteza associada à preparação dos padrões, nomeadamente dos padrões mais altos.

Todas as amostras de lamas da ETAR de Parada apresentaram quantidades consideráveis de *galaxolide*. A extração a húmido apresentou valores de recuperação semelhantes à extração a seco o que leva a concluir que a presença de água não influenciou o processo de extração. Uma vez que a adição de padrão, para os ensaios de recuperação, foi realizada após o processo de secagem, não é sensato concluir acerca do mesmo. Os resultados obtidos demonstram que a lama extraída a húmido apresentou concentrações de *galaxolide* superiores à lama extraída a seco. As lamas extraídas a seco apresentaram concentrações médias de *galaxolide* de 5253 ng/g e as extraídas a húmido de 24781 ng/g. Estes resultados levam a concluir que durante o processo de secagem da lama, com exposição ao ar ambiente em ventilação forçada, existe uma perda significativa de *galaxolide*. Em comparação com estudos realizados anteriormente, da deteção de *galaxolide* em lamas de ETAR desidratadas, o método QuEChERS, embora apresente recuperações inferiores (matriz seca) aos métodos de Horii *et al.* (2007), Shek *et al.* (2008) e Lv *et al.* (2010) tem a vantagem de usar menor quantidade de reagentes por isso ter um menor impacto no ambiente. Conclui-se ainda que as concentrações detetadas nas lamas apresentam quantidades muito elevadas de *galaxolide* e que por isso faz sentido apostar em tratamentos mais eficazes na remoção do mesmo. Uma vez que as lamas tratadas são posteriormente utilizadas na valorização agrícola existe uma alta probabilidade de contaminarem os solos e consequentemente a cadeia alimentar.

5 Limitações e Trabalho Futuro

Apesar dos principais objetivos deste trabalho terem sido cumpridos, existem alguns pontos que ficaram por desenvolver devido a limitações de tempo. Assim como sugestão para trabalho futuro, realço,

No que diz respeito à validação do método, o estudo da precisão intermédia e da repetibilidade deveriaser também realizado em amostras reais.

Para além dos ensaios de recuperação apresentados neste estudo seria conveniente fazer a adição de padrão antes do processo de secagem para assim se poder realizar uma análise mais sensata da influência do processo de secagem. Seria também interessante testar/comparar alguns métodos de preparação das amostras, como por exemplo centrifugação e liofilização, previamente à extração pelo método QuEChERS.

Uma vez que as lamas têm vários compostos interferentes e o HPLC, por si só, não pode garantir que o pico identificado como *galaxolide* se trate exclusivamente de *galaxolide*, seria conveniente a confirmação da existência deste composto por outra metodologia analítica, como por exemplo por GC-MS.

Tendoum período de trabalho mais alargado seria também interessante planear uma amostragem mais representativa, recolhendo lamas de tempos de retenção (do tanque de arejamento) diferentes. Estes resultados podiam permitir uma discussão mais aprofundada da variação das concentrações de *galaxolide* com base em outros fatores relevantes, como condições meteorológicas, fins-de-semana ou períodos de férias em que possa haver variação nas concentrações.

6 Bibliografia

- Akoh, C.C., Min, D.B., “Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology”, Marcel Dekker, Inc., 2002.
- Bester, K., “Analysis of musk fragrances in environmental samples”, *Journal of Chromatography A*, vol.1216, pág.470-480, 2009.
- Bester, K., “Personal Care Compounds in the Environment, Pathways, Fate, and Methods of Determination”, Wiley-VCH, 2007.
- Bio-Rad Laboratories, “Bio-Beads® S-X Beads Gel Permeation Chromatography” Instruction Manual, 2000.
- Bitsch, N., Dudas, C., Körner, W., Failing, K., Biselli, S., Rimkus, G., Brunn, H., “Estrogenic Activity of Musk Fragrances Detected by the E- Screen Assay Using Human MCF-7 Cells”, *Archives of Environmental Toxicology*, vol.43, pág.257-264, 2002.
- Camões, M.F.G.F.C., “EURACHEM/CITAC”, 2001.
- Castro, M.D.L., Capote, F.P., “Soxhlet extraction: Past and present panacea”, *Journal of Chromatography A*, vol.1217, pág.2383-2389, 2010.
- Chase, D.B.S., “Occurrence and Fate of Synthetic Musk Fragrances in Effluent and Non-Effluent Impacted Environments: Detection in Environmental Matrices and Implications for Water Policy”, thesis Master of Sciences, Texas, 2011.
- Chemnet, cas.chemnet.com, acessado a 28 de Setembro de 2013.
- Chen, D., Zeng, X., Sheng, Y., Bi, X., Gui, H., Sheng, G., Fu, J., “The concentrations and distribution of polycyclic musks in a typical cosmetic plant”, *Chemosphere*, vol.66, pág.252-258, 2007.
- Chen, F., Ying, G.-G., Ma, Y.-B., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., Peng, F.-J., “Field dissipation and risk assessment of typical personal care products TCC, TCS, AHTN and HHBC in biosolid-amended soils”, *Science of the Total Environment*, vol.470-471, pág.1078-1086, 2014.
- Comissão Europeia, “Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers- concerning musk xylene and musk ketone”, 28th plenary meeting, 25 Maio 2004.
- Correia, P., Cruz, A., Santos, L., Alves, A., “Human dermal exposure to galaxolide from personal care products”, *International Journal of Cosmetic Science*, vol.35, pág.299-309, 2013.

- Cunha, A.C.C, “Synthetic musks in personal care products: method development and exposure assessment” dissertação de mestrado, FEUP, 2012.
- David, V., Moldoveanu, S.C., “Essentials in Modern HPLC Separations”, Elsevier, 2013.
- Dean, J.R., “Extraction Techniques in Analytical Sciences”, John Wiley & Sons, Ltd., 2009.
- Dionex, <http://www.dionex.com.br/?p=texto.asp&c=analitica>, acedido em 24 de Outubro de 2013.
- Dong, M.W., “Modern HPLC for Practicing Scientists”, John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- ECHA 2008, “ Agreement of the member state committe on identification os 5- ter- butyl- 2,4,6- trinitro-m-xylene (musk xylene) as a substance of very high concern”, <http://echa.europa.eu/documents/10162/31e4b726-12ed-49b6-8596-5f09eccd74fa>, acedido em 14 de Outubro de 2013.
- Eh, M., “New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musks Odorants”, Chemistry & Biodiversity, 2004.
- Georgakopoulos, P., Zachari, R., Mataragas, M., Athanasopoulos, P., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., “Optimisation of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology”, Food Chemistry, vol.128, pág.536-542, 2011.
- Gilson, Inc. World Headquarters, CT Laboratories of Baraboo, “Automated Gel Permeation Chromatography (GPC) clean-up of soil extracts prior to analysis for semivolatile organic compounds by GC/MS (USEPA Method 8270)”, http://www.gilson.com/Resources/GPC_Semivolatiles_in_soil.pdf, acedido em 5 de Novembro de 2013.
- Guardia, M., Garrigues, S., “Handbook of green analytical chemistry”, Wiley, 2012.
- Guo, -H.G., Wu, -C.F., He, -P.H., Zhang, -Q.R., Li, -X.H., “Screening level ecological risk assessment for synthetic musks in surface water of Lake Taihu, China”, Stoch Environ Res Risk Acess, vol.27, pág.111-119, 2013.
- Guo, R., Lee, I.-S., Kim, U.-J., Oh, J.-E., “Occurrence of synthetic musks in Korean sewage sludges”, Science of the Total Environment, vol. 408, pág.1634-1639, 2010.
- HERA, “ Polycyclic musks- AHTN, HHCB”, Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products, <http://www.heraproject.com/files/28-E-36551E10-F8EF-E807-E4199B9BB0076A9F.pdf>, acedido em 19 de Setembro 2004.

- Hitachi- High Tech, http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_3.html,
acedido em 25 Novembro de 2013
- Homem, V., Silva, J.A., Cunha, C., Alves, A., Santos, L., “New analytical method for the determination of musks in personal care products by QuEChERS extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Separation Science*, vol.36, pág.2176-2184, 2013.
- Homem, V.M.F.C., “Tecnologias alternativas de remoção de antibióticos de águas contaminadas” dissertação de doutoramento, FEUP, 2011.
- Horii, Y., Reiner, J.L., Loganathan, B.G., Kumar, K.S., Sajwan, K., Kannan, K., “Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA”, *Chemosphere*, vol. 68, pág.2011-2020, 2007.
- HPLC, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif>,
acedido em 6 de Novembro de 2013.
- <http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic41-03-006.html> acessado em 24 Outubro de 2013.
- Hu, Z., Shi, Y., Cai, Y., “Reprint of: Concentrations, distribution, and bioaccumulation of synthetic musks in the Haihe River of China”, *Chemosphere*, vol.85, pág.262-267, 2011.
- Huie, C.W., “A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 373, pág.23-30, 2002.
- Hutter, -P.H., Wallner, P., Moshhammer, H., Hartl, W., Sattelberger, R., Lorbeer, G., Kundi, “Blood concentrations of polycyclic musks in healthy young adults”, *Chemosphere* vol.59, pág.487-492, 2005.
- IFRA, “44th Amendment Musk Xylene”, 2009, <http://www.ifraorg.org/en-us/library/t/21002/s0/p3#.UuDkpmSp1PM>,
acedido em 10 de Setembro de 2013.
- Jenkins, S.R., Armstrong, C.W., Monti, M.M., “Health effects of biosolids applied to land: available scientific evidence”, 2007 e Ternes, T.A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B., “Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?” *Water Research* vol.37, pág.1976-1982, 2003.
- Jornada, D.H., Caten, C., “Uma revisão sobre abordagens e métodos de cálculo de incerteza”, V congresso latino americano de metrologia, Brasil, 2007.

- Kallenborn, R., Gatermann, R., Planting, S., Rimkus, G.G., Lund, M., Schlabach, M., Burkow, I.C., "Gas chromatographic determination of synthetic musk compounds in Norwegian air samples", *Journal of Chromatography A*, vol.846, pág.295-306, 1999.
- Kenneth, A.J., "Dietary Interventions in Autism Spectrum Disorders", Jessica Kingsley Publishers, 2009.
- Kettle, A., "Use of Accelerated Solvent Extraction with In-Cell Cleanup to Eliminate Sample Cleanup During Sample Preparation", Thermo Scientific, http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114403-WP-ASE-InCell-Cleanup_WP70632_E.pdf, acedido em 17 Novembro 2013.
- King, J.W., List, G.R., "Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry", AOCS Press, 1996.
- LeBlanc, R.J., Matthews, P., Richard, R.P., "Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource", *Un-Habitat*, pág.123, 2006.
- Lookchem, www.lookchem.com, acedido em 20 de Outubro de 2013.
- López, R., Goñi, F., Etxandia, A., Millán, E., "Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography- electron capture detection", *Journal of Chromatography B*, vol.846, pág.298-305, 2007.
- Lv, Y., Yuan, T., Hu, J., Wang, W., "Seasonal occurrence and behavior of synthetic musks (SMs) during wastewater treatment process in Shanghai, China", *Science of the Total Environment*, vol.408, pág.4170-4176, 2010.
- Maekawa, A., Matsushima, Y., Onodera, H., Shibutani, M., Ogasawara, H., Kodama, Y., Kurokawa, Y., Hayashi, Y., "Long- term toxicity/ carcinogenicity of musk xylol in B6C3F mice", *Food and Chemical Toxicology*, vol.28, 1990.
- Mastovska, K., Lehotay, S.J., "Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues", *Journal of Chromatography A*, vol.1040, pág.259-272, 2004.
- McGuinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M., "Fragrance material review on 3-methyl-1-cyclopentadecanone. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association", 2001a.
- McGuinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M., "Fragrance material review on ethylene brassylate. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association", 2001b.

- McGuinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M., “Fragrance material review on E- and Z-oxacyclohexadec-12(+13)-en-2-one.. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association”, 2001c.
- McMaster, M.C., “HPLC, A practical user’s guide”, John Wiley & Sons, Inc. 2007.
- Meehan, E., “Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent”, *Analytica Chimica Acta*, vol.557, pág2-6,2006.
- Meeuwen, J.A., Son, O., Piersma, A.H., Jong, P.C., Berg, M., “Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 230, pág.372-382, 2008.
- Mitsui, T., “New Cosmetic Science”, Elsevier, 1997.
- Moldovan, Z., “Occurences of pharmaceuticals and personal care products as micropollutants in rivers from Romania”, *Chemosphere*, vol.64, pág.1808-17, 2006.
- Morris, K., “Techiques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids”, Newport Somerville Innovation, Limited, 2010.
- Müller, J., Böhmer, W., Litz, N.T., “Occurence of polycyclic musks in sewage sludge and their behaviour in soils and plants”, *J. Soil Sediment*, vol.6, pág.231-235, 2006.
- Nakata, H., Shinohara, R.-I., Nakazawa, Y., Isobe, T., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Tanabe, S., Zakaria, M.P., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Kim, E.Y., Min, B.Y., We, S.-U., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Frank, D., Lauenstein, G., Kannan, K., “Asia- Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters”, *Marine Pollution Bulletin*, vol.64, pág.2211-2218, 2012.
- Nogueroles, M.L., -Madeleine, S.L., Chisvert, A.S., Pichon, V., “Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent”, *Talanta*, vol.110, pág.128-134, 2013.
- Osemwengie, L.I., Steinberg, S., “On- site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra- trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography- mass spectrometry in the full- scan mode”, *Journal of Chromatography A*, vol.932, pág.107-118,2001.
- Patnaik, P., “Handbook of Environmental Analysis- chemical pollutants in air, water, soil, and solid wastes”, CRC Press, 2010.
- Pawliszyn, J., “Handbook os solid phase microextraction”, Elsevier Inc., 2012.

- Pawliszyn, J., "Sampling and sample preparation for field and laboratory", Elsevier Science, 2002.
- Peck, A.M., "Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.386, pág.907-939, 2006.
- Peck, A.M., Hornbuckle, K.C., "Synthetic musk fragrance in urban and rural air of Iowa and the Great Lakes", *Atmospheric Environment*, vol.40, pág.6101-6111, 2006.
- Pickthall, J., F.R.I.C., "The musk Odour", *Journal of the society of cosmetic chemists*, pág.423-435, 1960.
- Pizzutti, I.R., Kok, A., Zanella, R., Adaime, M.B., Hiemstra, M., Wickert, C., Prestes, O.D., "Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography- tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization", *Journal of Chromatography A*, vol.1142, pág.123-136, 2007.
- Pombeiro, A.J.L.O., "Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial", Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- Raaman, N., "Phytochemical Techiques", New India Publishing Agency, 2006.
- Ratola, N., Martins, L., Alves, A., "Ochratoxin A in wines- assenssing global uncertainty associated with the results", *Analytica Chimica Acta*, vol.513, pág.319-324, 2004.
- Regueiro, J., -Jares, C.G., Llompарт, M., Lamas, J., Cela, R., "Development of a method based on sorbent trapping followed by solid-phase microextraction for the determination of synthetic musks in indoor air", *Journal of Chromatography A*, vol.1216, pág.2805-2815, 2009.
- Ren, Y., Wei, K., Liu, H., Sui, G., Wang, J., Sun, Y., Zheng, X., "Occurrence and removal of selected polycyclic musks in two sewage treatment plants in Xi'an, China", *Front. Environ. Sci. Eng.*, vol.7, pág.166-172, 2013.
- Rimkus, G.G., "Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment", *Toxicology Letters*, vol.111, pág.37-56, 1999.
- Ritter, L., Solomon, K.R., Forget, J., "A Review of selected persistent organic pollutants", Canadian Network of Toxicology Centres, 1995.
- Roosens, L., Covaci, A., Neels, H., "Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application", *Chemosphere*, vol.69, pág.1540-1547, 2007.

Salgado, R., Marques, R., Noronha, J.P., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A.M., “Assessing the removal of pharmaceuticals and personal care products in a full-scale activated sludge plant”, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol.19, pág.1818-1827, 2012.

Schreurs, R.H.M.M., Sonneveld, E., Jansen, J.H.J, Seinen, W., Burg, B., “Interaction of polycyclic musks and UV filters with the Estrogen Receptor (ER), Androgen receptor (AR), and Progesterone Receptor (PR) in reporter gene bioassays” *Toxicological Sciences*, vol. 83, pág. 264-272, 2005.

Shek, W.M., Murphy, M.B., Lam, J.C.W., Lam, “Synthetic polycyclic musks in Hong Kong sewage sludge”, *Chemosphere*, vol.71, pág.1241-1250,2008.

Sigma Aldrich, www.sigmaaldrich.com acedido em 28 Outubro de 2013.

Silva, E.S.M.S., “Deteção de fragrâncias sintéticas (musks) em produtos de higiene e de cuidado pessoal por GC-MS” dissertação de mestrado, FEUP, 2013.

Simmons, Denina B.D., Marlatt, V.L., Trudeau, V.L., Sherry, J.P, Metcalfe, C.D., “Interaction of Galaxolide with the human and trout estrogen receptor - α ”, *Science of the Total Environment*, vol.408, pág.6158-6164,2010.

Skoog, D.A., Holler, F.J., “Analytical Chemistry na introduction”, Brooks Cole publishing company, 2000.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., “Principles of Instrumental Analysis”, Brooks Cole, 2006.

Smyth, S.A., Lishman, L., Alaei, M., Kleywegt, S., Svoboda, L., Yang, J.-J., Lee, H.-B., Seto, P., “ Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and nitro musks in sewage sludge”, *Chemosphere*, vol.67, pág.267-275, 2007.

Sousa, R.J.V., “ Estratégias de gestão de lamas das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR). Extrusão de lamas para aplicação na agricultura”, dissertação de mestrado,FEUP, 2005.

SPE, <http://www.teknokroma.es/en/Productos/filtration-and-extraction/6/solid-phase-extraction-spe/106/433/vacuum-manifold.aspx>, acedido em 24 de Outubro.

Spellman, F.R., Bieber, R.M., “Environmental Health and Science- Desk Reference”, Government Institutes, 2012.

Sperling, M., “Biological Wastewater Treatment- Sludge Treatment and Disposal”, IWA, 2007.

SPME, <http://analisisvinicos.com/spme.php.htm>, acedido em 20 de Outubro de 2013.

- Stan, H.-J., “Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection State-of-the-art use of modified DFG- multimethod S19 and automated data evaluation”, *Journal of Chromatography A*, vol.892, pág.347-377, 2000.
- Sumner, N.R., Guitart, C., Fuentes, G., Readman, J.W., “Inputs and distribution of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study”, *Environmental Pollution*, vol.158, pág.215-222, 2010.
- Takaoka, H., “Structure-odour relationships of macrocyclic musks and harmony with the environment”, *International Conference in Budapest, Hungary*, 2007.
- Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Löffler, D., Keller, E., Lacida, B.B., Alder, A.C., “Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS”, *Journal of Chromatography A*, vol.1067, pág.213-223, 2005.
- Thavaneswaran, S., “The Sense of Scents”, *Cosmos*, 2008.
- The good scents company, <http://www.thegoodscentcompany.com/>, acedido em 6 de Setembro de 2013.
- Theimer, T. E.,” *Fragrance Chemistry- The Science of the Sense of Smell*”, Academic Press, Inc., pág.435, 1982.
- Vallecillos, L., Pocurull, E., Borrull, F., “A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, vol.1314, pág.38-43, 2013.
- Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., “*Pesticide Protocols*”, Humana Press, 2006.
- Villa, S., Assi, L., Ippolito, A., Bonfanti, P., Finizio, A., “First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: Spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy)”, *Science of the Total Environment*, vol.416, pág.137-141, 2012.
- Wang, M., Peng, C., Chen, W., Markert, B., “Ecological risks of polycyclic musk in soils irrigated with reclaimed municipal wastewater”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol.97, pág.242-247, 2013.
- Wang, Y., Bonilla, M., McNair, H.M., Khaled, M., “Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of food products”, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol.20 , pág.213-216 ,1997.

- Wei, M.-C., Jen, J.-F., “Determination of chlorophenols in soil samples by microwave assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection”, *Journal of Chromatography A*, vol.1012, pág.111-118, 2003.
- Wilkowska, A., Biziuk, M., “Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology”, *Food Chemistry*, vol.125, pág.803-812, 2011.
- William, W., Christie, “*Lipid Analysis*”, Pergamon Press, 1982.
- Wilson, S.C., Davidson, R.-D., Jones, K.C., “Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludges applied to agricultural soils: The potential for downward movement to groundwaters”, *The Science of the Total Environment*, vol.185, pág.45-57, 1996.
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Klusk, K.O., Bengtsson, B.-E., “Inhibition of larvar development of the marina copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances”, *The Science of the Total Environment*, vol.305, pág.53-64, 2003.
- Yang, J.-J., Metcalfe, C.D., “Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids”, *Science of the Total Environment*, vol.363, pág.149-165, 2006.
- Zeng, X., Sheng, G., Xiong, Y., Fu, J., “Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC-EI-MS”, *Chemosphere*, vol.60, pág.817-823, 2005.
- Zhou, H., Huang, X., Gao, M., Wang, X., Wen, X., “Distribution and elimination of polycyclic musks in three sewage treatment plants of Beijing, China”, *Journal of Environmental Sciences*, vol.21, pág.561-567, 2009.

Anexo 1 - Preparação de padrões

a) **Massa de galaxolide presente na porção pesada de solução comercial de galaxolide e respetiva concentração da solução “mãe” (preparada em etanol)**

$$m \text{ gota de dietilftalato} = 0,0105 \text{ g}$$

$$m \text{ galaxolide presente} = \frac{0,0105 \text{ mg}}{2} = 0,00525 \text{ g} = 5,25 \text{ mg}$$

Sendo o balão de 100 mL a concentração da solução “mãe” foi de 52,5 mg/L

$$c = \frac{5,25 \text{ mg}}{0,1 \text{ L etanol}} = 52,5 \text{ mg/L etanol}$$

b) **Concentração do padrão para realização de spikes (preparado em ACN)**

$$m \text{ gota de dietilftalato} = 0,0091 \text{ g}$$

$$m \text{ galaxolide presente} = \frac{0,0091 \text{ mg}}{2} = 0,00455 \text{ g} = 4,55 \text{ mg}$$

Sendo o balão de 10 ml a concentração do padrão para sipkes foi de 455 mg/L.

$$c = \frac{4,55 \text{ mg}}{0,01 \text{ L etanol}} = 455 \text{ mg/L ACN}$$

Anexo 2 - Parâmetros de validação do método analítico

a) Padrões da reta de calibração

Tabela A.2.1- Identificação dos padrões da reta de calibração.

Padrão	X - Conc.(µg/L)	Y - Área (µV.s)	Y _m - Área _m	Desvio-padrão	%CV
P1	1,00	12999 12708	12854	206	1,6
P2	5,00	51072 48272	49672	1980	4,0
P3	10,00	88468 85608	87038	2022	2,3
P4	40,00	329721 330722	330222	708	0,2
P5	80,00	657400 660845	659123	2436	0,4
P6	120,00	1004447 993928	999188	7438	0,7
P7	160,00	1315101 1310586	1312844	3193	0,2
P8	200,00	1659159 1655648	1657404	2483	0,1

b) Valores experimentais

Tabela A.2.2- Valores experimentais.

Padrão	$Y_m - \text{Área}_m$	X^2	$(X - X_{\text{médio}})$	$(X - X_{\text{médio}})^2$	$(Y - Y_{\text{médio}})$	$(Y - Y_{\text{médio}})^2$	$(X - X_{\text{médio}}) \cdot (Y - Y_{\text{médio}})$	Y_{reta}	$(Y_{\text{reta}})^2$	$(Y - Y_{\text{reta}})$	$(Y - Y_{\text{reta}})^2$
P1	12854	1	-76	5776	-625689	391487037566	47552383	12588	158445714	266	70744
P2	49672	25	-72	5184	-588871	346768760206	42398694	45533	2073211666	4139	17135178
P3	87038	100	-67	4489	-551505	304157489273	36950818	86714	7519282960	324	105106
P4	330222	1600	-37	1369	-308321	95061993202	11407886	333801	111423367348	-3580	12815606
P5	659123	6400	3	9	20580	423526110	61739	663252	439902564183	-4129	17048715
P6	999188	14400	43	1849	360645	130064635703	15507724	992702	985456524047	6486	42066524
P7	1312844	25600	83	6889	674301	454681501451	55966962	1322152	1748085246942	-9308	86643496
P8	1657404	40000	123	15129	1018861	1038077227891	125319872	1651602	2727788732866	5802	33658925
Média	638543	11016	0	5087	0	345090271425	41895760	638543	752800921966	0	26193037
soma	5108342	88126	0	40694	0	2760722171399	335166080	5108342	6022407375725	0	209544294

c) Parâmetros de avaliação da reta de calibração

Tabela A.2.3- Parâmetros de avaliação da reta de calibração.

Nº padrões	Nº ensaios	a	b	$s_{Y/X}$	s_a	s_b	R^2	S_a/a (%)	$b - s_b$	$b + s_b$	R	Graus liberdade	t	ts_a	ts_b
8	2	2836	4351	5910	29	3075	0,9999	0,4	1277	7426	1,000	6	1,943	57	5974

Tabela A.2.4- Tabela do cálculo da banda de confiança (95%).

	minimo	máximo	
a	8179	8236	8293
b	-1623	4351	10325
C (ppb)	Área	Área	Área
1	6556	12588	18619
5	39274	45533	51791
10	80170	86714	93257
40	325550	333801	342052
80	652724	663252	673779
120	979897	992702	1005506
160	1307070	1322152	1337233
200	1634244	1651602	1668960

d) Ensaios de Precisão

Tabela A.2.5- Repetibilidade para os padrões.

C (µg/L)	Area	Média	CV%
1	20947	21056	5,5
	19965		
	22255		
80	708794	728276	3,6
	718314		
	757719		
200	1695330	1689678	0,2
	1690097		
	1686724		
	1686561		

Tabela A.2.6- Precisão Intermédia para os padrões.

C (µg/L)	Area 1	Area 2	Média	CV%
1	9191	9395	9293	39,3
	13176	13630	13403	
	20947	19965	20456	
80	669692	667625	668659	3,7
	671208	672800	672004	
	708794	718314	713554	
200	1701870	1684773	1693322	0,7
	1676729	1666593	1671661	
	1695330	1690097	1692714	

e) Ensaio de Exatidão

Tabela A.2.7- Determinação da percentagem de recuperação da lama seca.

C (µg/L)	%Rec 1	%Rec 2	Média	Desvpad	CV%
1	69,13	63,68	66,41	3,9	5,8
50	77,35	71,95	74,65	3,8	5,1
100	67,54	62,22	64,88	3,8	5,8

Tabela A.2.8- Determinação da percentagem de recuperação da lama húmida.

C (µg/L)	%Rec 1	%Rec 2	Média	Desvpad	CV%
1	99,16	84,43	91,80	10,4	11,3
50	71,91	81,25	76,58	6,6	8,6
100	63,04	64,60	63,82	1,1	1,7

f) Incerteza Global

A incerteza associada à preparação dos padrões foi calculada a partir da equação,

$$U_1 = \left[\sum \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2 \right]^{1/2}$$

onde Δm_i é o erro associado ao material de medição e m_i o valor medido.

Tabela A.2.9- Determinação da incerteza associada à preparação da solução “mãe”.

Solução Mãe 45.5 mg/L	
m pesada (mg)	10,5
incerteza m (g)	0,0001
v (mL)	100,00
incerteza v (mL)	16
% Pureza	50
C (mg/L)	52,5
$u_{C \text{ mãe}}$ (mg/L)	8
$U_{C \text{ mãe}}$	0,161

Tabela A.2.10- Determinação da incerteza associada à preparação da solução intermédia.

Solução Intermédia 200 µg/L	
V pipetar (µL)	95,2
incerteza v (µL)	0,8
v (mL)	25,00
incerteza v (mL)	0,06
C (µg/L)	200
$u_{C \text{ p8}}$ (µg/L)	32
$U_{C \text{ p8}}$	0,161

Tabela A.2.11- Determinação da incerteza associada à preparação dos padrões.

Padrão	V _{pipetar sol. intermédia} (μL)	incerteza v (μL)	V _{final} (mL)	incerteza v (mL)	C (μg/L)	u (μg/L)	U ₁
P1	50	0,35	10,000	0,025	1	0,2	0,162
P2	250,0	1,75	10,000	0,025	5	0,8	0,162
P3	500,0	3,5	10,000	0,025	10	1,6	0,162
P4	2000,0	15	10,000	0,025	40	6,5	0,162
P5	2000,0	15	5,000	0,025	80	12,9	0,162
P6	3000,0	25	5,000	0,025	120	19,4	0,162
P7	4000,0	30	5,000	0,025	160	25,8	0,162
P8	---	---	---	---	200	32,3	0,161

A incerteza associada à reta de calibração foi calculada a partir das equações,

$$U_2 = \frac{S_{x_0}}{x_0} S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{a^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

onde S_{x_0} é o desvio- padrão de uma determinada concentração, x_0 a concentração, S_{y/x_0} desvio- padrão residual, a o declive da regressão linear, n o número de padrões da reta, m o número de medições realizadas, y_0 a área de cada x_i , \bar{y} a média dos valores de y_i , x_i a concentração de cada padrão e \bar{x} a média de x .

Tabela A.2.12- Determinação da incerteza associada à reta de calibração.

Padrão	C (μg/L)	S _{x0} (μg/L)	U ₂
P1	1	0,628	0,628
P2	5	0,622	0,124
P3	10	0,615	0,062
P4	40	0,583	0,015
P5	80	0,567	0,007
P6	120	0,588	0,005
P7	160	0,638	0,004
P8	200	0,718	0,004

A incerteza associada à precisão foi calculada a partir da equação,

$$U_3 = \frac{s}{y_{med}\sqrt{n}}$$

onde, s é o desvio-padrão de cada medição, y_{med} a média das medições e n o número de medições.

Tabela A.2.13- Determinação da incerteza associada à precisão.

C (µg/L)	Area 1	Area 2	Média	Média	Desvpad	CV%	U ₃
1	9191	9395	9293				
	13176	13630	13403	14384	5646	39,3	0,227
	20947	19965	20456				
80	669692	667625	668659				
	671208	672800	672004	684739	25011	3,7	0,021
	708794	718314	713554				
200	1701870	1684773	1693322				
	1676729	1666593	1671661	1685899	12334	0,7	0,004
	1695330	1690097	1692714				

A incerteza associada à exatidão foi calculada a partir da equação,

$$U_4 = \frac{s(\eta)}{\sqrt{n}}$$

onde s é o desvio- padrão relativo da percentagem média de recuperação, y_{med} a média das medições e n o número de medições.

Tabela A.2.14- Determinação da incerteza associada à exatidão da lama seca.

C (µg/L)	%Rec 1	%Rec 2	Média	Desvpad	CV%	U ₄
1	69,13	63,68	66,41	3,9	5,80	0,041
50	77,35	71,95	74,65	3,8	5,12	0,036
100	67,54	62,22	64,88	3,8	5,80	0,041

Tabela A.2.15- Determinação da incerteza associada à exatidão da lama húmida.

C (µg/L)	%Rec 1	%Rec 2	Média	Desvpad	CV%	U ₄
1	99,16	84,43	91,80	10,4	11,35	0,080
50	71,91	81,25	76,58	6,6	8,62	0,061
100	63,04	64,60	63,82	1,1	1,73	0,012

A incerteza global foi calculada a partir da soma de todas as incertezas intermédias.

$$U_{GLOBAL} = U_1 + U_2 + U_3 + U_4$$

Tabela A.2.16- Determinação da incerteza global da lama húmida.

	Preparação de padrões	Curva de calibração	Precisão	Exactidão	
C (µg.L⁻¹)	% U₁	% U₂	% U₃	% U₄	% U_{global}
1	16,2%	62,8%	22,7%	8,0%	68,8
5	16,2%	12,4%	22,7%	8,0%	30,8
10	16,2%	6,2%	2,1%	6,1%	17,8
40	16,2%	1,5%	2,1%	6,1%	16,8
80	16,2%	0,7%	2,1%	6,1%	16,7
120	16,2%	0,5%	0,4%	1,2%	16,7
160	16,2%	0,4%	0,4%	1,2%	16,7
200	16,1%	0,4%	0,4%	1,2%	16,7

Anexo 3 - *Galaxolide* nas lamas da ETAR de Parada

a) Concentração de *galaxolide* detetada nos ensaios de brancos.

Tabela A.3.1- Deteção de HHCB em ensaios de branco.

Branco	Ensaio	Concentração (ug/kg)	%CV	Média (ng/g)	Média brancos (ng/g)
03-Dez	1	16	111	74	40
03-Dez	2	131			
04-Dez	1	0	142	24	
04-Dez	2	49			
05-Dez	1	8	85	21	
05-Dez	2	33			

b) Concentrações de HHCB detetadas nas amostras de lama desidratadas.

Tabela A.3.2- Concentrações de HHCB detetadas na lama seca e na lama húmida com respetiva conversão em base seca.

Galaxolide na lama (mg HHCB/Kg lama seca)						
Amostra	Seca	%CV	Húmida	%CV	Teor de humidade	Conversão
A1	2,820	2,7	-	-	-	-
A2	4,103	10,5	4,269	1,3	0,78	18,985
A3	3,948	3,6	4,414	1,1	0,76	18,404
A4	3,407	3,5	5,118	7,5	0,76	20,931
A5	3,275	18,2	4,644	8,5	0,78	21,458
A6	2,892	2,6	3,849	11,5	0,80	18,778
A7	4,000	13,9	3,804	22,9	0,79	18,309
A8	4,703	0,3	4,532	0,1	0,74	17,679

Tabela A.3.3- Concentrações de HHCb detetadas na lama seca e na lama húmida com o desconto dos ensaios de branco.

<i>Galaxolide</i> na lama (ng HHCb/ g lama seca)					
Amostra	Seca	Húmida	Média branco	Seca-Branco	Húmida-Branco
A1	2820	-		2780	-
A2	4103	18985		4063	18945
A3	3948	18404		3908	18364
A4	3407	20931	40	3367	20891
A5	3275	21458		3235	21418
A6	2892	18778		2852	18738
A7	4000	18309		3960	18269
A8	4703	17679		4663	17639

Tabela A.3.4- Concentrações de HHCb da lama seca e húmida convertidas para uma recuperação total (100%).

<i>Galaxolide</i> na lama (ng HHCb/ g lama seca)							
Amostra	Média %Rec seca	Média%Rec húmida	seca	húmida	conversão seca	conversão húmida	diferença entre húmida e seca
A1			2780	-	4053	-	-
A2			4063	18945	5923	24476	18554
A3			3908	18364	5697	23726	18029
A4	69	77	3367	20891	4908	26991	22083
A5			3235	21418	4716	27672	22956
A6			2852	18738	4158	24210	20052
A7			3960	18269	5772	23604	17832
A8			4663	17639	6798	22789	15991
				média	5253	24781	19357